

# **Struktur und Dynamik von Proteinadsorbaten an planaren Polyacrylsäurebürsten**

## **Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

an der Fakultät Chemie der  
Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

**Oliver Hollmann**

aus Mutlangen

Dortmund

2008



Erstgutachter: PD Dr. Claus Czeslik

Zweitgutachter: Prof. Dr. H. Rehage

Tag der mündlichen Prüfung:



## **Danksagung**

Zuerst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Roland Winter für die freundliche Aufnahme in seinem Arbeitskreis und der Möglichkeit diese Arbeit anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt selbstverständlich Herrn PD Dr. Claus Czeslik für die Überlassung des Themas und seine ausgezeichnete Betreuung der Arbeit, die einen andauernden Fortschritt und Erfolg der Experimente ermöglicht hat. Seine wertvollen Ratschläge bei der Durchführung der Messungen und die ständige Diskussionsbereitschaft haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. H. Rehage danke ich für die freundliche Übernahme des Ko-referats.

Für die freundschaftliche und kompetente Unterstützung bei der Durchführung der Neutronenstreuexperimente am Helmholtz-Zentrum für Materialien und Energie in Berlin (HZB) und am Paul-Scherer Institut (PSI) in der Schweiz bedanke ich mich bei Dr. Roland Steitz sowie Dr. Thomas Gutberlet.

Bei allen weiteren wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Mitarbeitern des Arbeitskreises Physikalische Chemie I möchte ich mich für die prompte Unterstützung bei dem einen oder anderen Experiment sowie für das freundliche Arbeitsklima bedanken.

Und zu guter Letzt danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die notwendige finanzielle Unterstützung.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Publikationsliste</b>	<b>III</b>
1 Einleitung.....	1
2 Theoretische Grundlagen.....	3
2.1 Triebkräfte der Proteinadsorption.....	3
2.2 Struktureigenschaften der untersuchten Proteine.....	7
2.2.1 $\alpha$ -Lactalbumin.....	7
2.2.2 Lysozym.....	8
2.2.3 Serumalbumin.....	9
2.2.4 Insulin.....	10
3 Methodenteil.....	13
3.1 Absorptionsspektroskopie.....	13
3.2 Fluoreszenzspektroskopie.....	16
3.3 Neutronen- und Röntgenreflektometrie.....	30
3.4 <i>Surface-Plasmon-Resonance</i> (SPR)-Spektroskopie.....	33

4	Experimenteller Teil.....	37
4.1	Herstellung der Proteinlösungen.....	37
4.2	Präparation von Polyacrylsäure-Bürsten.....	37
4.3	Präparation von PAH/PSS-Multischichten.....	40
4.4	Durchführung der Röntgenreflektometriemessungen.....	41
4.5	Durchführung der Neutronenstreuexperimente.....	41
4.6	Durchführung der TIRF – Experimente.....	43
4.7	Durchführung der SPR – Experimente.....	45
5	Ergebnisse und Diskussion.....	46
5.1	Charakterisierung der PAS-Bürsten.....	46
5.2	SPR – Experimente zur Kinetik der Adsorption von BSA und Lysozym an einer PAS-Bürste.....	47
5.3	Neutronenreflektometriemessungen.....	57
5.3.1	Experimente zur Adsorption von $\alpha$ -LA an einer PAS-Bürste.....	57
5.3.2	Experimente zur Adsorption von BSA an einer PAS-Bürste.....	67
5.3.3	Experimente zur Adsorption von Insulin an einer PAH / PSS- Multischicht.....	76
5.4	TIRF – Spektroskopie - Messungen.....	85
5.4.1	Experimente zur Dynamik von adsorbiertem $\alpha$ -LA an einer PAS-Bürste.....	85
5.4.2	Experimente zum Einfluss der Salz- und Proteinkonzentration auf den Adsorptionsgrad von BSA und LSZ an PAS-Bürsten....	92
5.4.3	Experimente zum Einfluss der Temperatur auf den Adsorp- tionsgrad von BSA an PAS-Bürsten.....	100
6	Zusammenfassung.....	104
7	Literatur.....	108



Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen haben zu folgenden Publikationen geführt:

- 1) O. Hollmann und C. Czeslik, *Characterization of a planar PAA-Brush as a materials coating for a controlled protein immobilization*, Langmuir, 2006, 22, 3300.
- 2) O. Hollmann, T. Gutberlet und C. Czeslik, *Structure and protein binding capacity of a planar PAA brush*, Langmuir, 2007, 23, 1347-1353.
- 3) O. Hollmann, R. Steitz, C. Czeslik, *Structure and dynamics of  $\alpha$ -Lactalbumin adsorbed at a charged brush interface*, Phys. Chem. Chem. Phys., 2008, 10, 1448-1456.
- 4) O. Hollmann, C. Reichart und C. Czeslik, *Kinetics of protein adsorption at a poly(acrylic acid) brush studied by surface plasmon resonance spectroscopy*, Z. Phys. Chem, 2008, 222, 205-215.
- 5) C. Jeworrek, O. Hollmann, R. Steitz, R. Winter, C. Czeslik, *Interaction of IAPP and insulin with model interfaces studied using neutron reflectometry*, Biophys. J., im Druck.

## 1 Einleitung

Die spontane Adsorption von Proteinen lässt sich an nahezu jeder Oberfläche beobachten [1-5]. Diese Adsorbate können sich dabei vorteilhaft wie auch unvorteilhaft auf unseren Alltag auswirken [1, 3, 6]. Beispielsweise wird die Bildung eines Blutgerinnsels (Thrombus) an künstlichen Materialien, vor allem den glasartigen, durch die Adsorption eines Proteins initiiert, mit der Folge, dass sich dort Blutplättchen anlagern können. Während diese biologische Antwort nach einer Verletzung einerseits überlebenswichtig ist, verringert sie andererseits die Biokompatibilität von medizinischen Geräten und künstlichen Implantaten [7]. Oberflächenimmobilisierte Proteine sind auch in der medizinischen Diagnostik bei Festphasenimmuntests von entscheidender Bedeutung [8]. Zum Beispiel beruht ein Schwangerschaftstest auf der Detektion des Hormons Choriongonadotropin (hCG) im Urin der Frau durch das Protein Immunglobulin G (IgG). Es wird dabei ein *Sandwich*-artiger Komplex, bestehend aus zwei IgG-Molekülen (Antikörper) und einem hCG-Molekül (Antigen), ausgebildet. Während der erste Antikörper auf dem Testträger immobilisiert ist, ist der zweite Antikörper mit einem Enzym markiert, das wiederum eine Farbreaktion katalysiert und so einen positiven Nachweis sichtbar macht.

Eine andere Anwendung immobilisierter Proteine findet beim Einsatz von Protein-Biochips statt. Diese Chips können ähnlich wie beim Festphasenimmuntest auf der Basis von immobilisierten Antikörpern funktionieren oder, indem eine Chipoberfläche verwendet wird, die in verschiedenen Bereichen unterschiedlich chemisch oder biochemisch modifiziert ist, wodurch proteinspezifische Adsorption stattfinden kann [9]. Genauere Charakterisierung der adsorbierten Proteine kann dann anschließend z.B. fluoreszenz- oder massenspektroskopisch erfolgen.

Ein Beispiel für unvorteilhafte Proteinadsorption ist die Adsorption von Lysozym, einem Protein der Tränenflüssigkeit, auf der Oberfläche von Kontaktlinsen [10]. Das Proteinadsorbat kann zu einer Augenentzündung führen und muss deshalb in regelmäßigen Abständen entfernt werden.

Ebenfalls ungünstig wirkt sich die Adsorption von Proteinen an Unterwasser-Bauten und Schiffswänden aus. Der Proteinbiofilm ermöglicht dabei erst, dass sich Meeresorganismen wie Algen oder Muscheln daran festsetzen können, was zu erhöhtem Treibstoffverbrauch des Schiffes und Verrottung der Schiffswand führen kann [11].

Zu Beginn dieser Arbeit wurde gefunden, dass Oberflächen, die mit einer Polyacrylsäurebürste bedeckt sind, bei niedriger Ionenstärke große Mengen an Protein binden können [12]. Erhöht man die Ionenstärke der Proteinlösung allerdings auf nur etwa 100 mM, beobachtet man Proteindesorption bzw. Proteinresistenz der Oberfläche unabhängig von der Ladung der Proteinmoleküle. Die Ionenstärke der Lösung wirkt somit als physikalisch-chemischer „Schalter“ für die Proteinaffinität der Polyacrylsäurebürste. Dieser Effekt ist neu und einzigartig, denn er beruht offenbar nicht auf einer Abschirmung elektrostatischer Wechselwirkungen oder einer Veränderung der Proteinnettoladung. In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb planare Polyacrylsäure-Bürsten als neuartige Grenzflächenbeschichtung für die kontrollierte und variable Proteinadsorption umfassend charakterisiert werden. Es sollte u. a. der Adsorptionsgrad in Abhängigkeit verschiedener Parameter, die Proteinverteilung innerhalb der Bürste sowie die globale und innere Dynamik der adsorbierten Proteinmoleküle ermittelt werden. Als Untersuchungsmethoden kamen hauptsächlich die Neutronenreflektometrie und die *total internal reflection fluorescence* (TIRF)-Spektroskopie zum Einsatz, letztere auch zeitaufgelöst. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind für eine Reihe von biotechnologischen Anwendungen interessant, bei denen die Proteinaffinität einer Grenzfläche *in situ* variiert werden muss.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Triebkräfte der Proteinadsorption

Die Triebkräfte der Proteinadsorption haben sowohl enthalpischen als auch entropischen Charakter [13]. Wird bei der Adsorption die Enthalpie gesenkt ( $\Delta H < 0$ ) oder die Entropie erhöht ( $\Delta S > 0$ ), resultiert nach der Gibbs-Helmholtzschen Gleichung  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  (mit  $T$  = absolute Temperatur), eine Abnahme der Gibbs-Energie  $G$  und damit eine Immobilisierung des Proteins an der Grenzfläche. Da Proteinmoleküle eine komplexe Struktur besitzen, bestehen in wässriger Lösung unterschiedliche Wechselwirkungen zu der Grenzfläche. Zu nennen sind zunächst die van-der-Waals- und Coulomb-Wechselwirkung, die zu einer attraktiven Wechselwirkung und damit negativen Adsorptionsenthalpie führen können. Van-der-Waals-Kräfte zwischen Atomen oder Molekülen entstehen durch die Wechselwirkung zweier permanenter Dipole (Keesom-Kräfte), einem permanenten und einem induzierten Dipol (Debye-Kräfte) oder zwischen zwei induzierten Dipolen (London- oder Dispersionskräfte) [14]. In jedem Fall ist das resultierende van-der-Waals-Potential  $V(r)$  negativ, beschreibt damit eine attraktive Wechselwirkung und geht gegen Null mit zunehmendem Abstand  $r$  gemäß  $V(r) \sim 1/r^6$ . Die van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen zwei großen Körpern lässt sich näherungsweise bestimmen, indem die paarweise Interaktion der beteiligten Atome aufsummiert wird. Daraus wird ein Ausdruck erhalten, der von der Geometrie der beiden Körper und ihrer Materialart abhängt, die durch die Hamaker-Konstante beschrieben wird. Für ein sphärisches Protein, das mit einer planaren Oberfläche wechselwirkt, sagt die Hamaker-Näherung eine Änderung der freien Gibbs-Energie nach

$$\Delta G = -\frac{A_{213}}{6} \left( \frac{R}{d} + \frac{R}{d+2R} + \ln \frac{d}{d+2R} \right) \quad (2.1-1)$$

voraus [14]. R ist hierbei der Radius des Proteins und d die Distanz zwischen der Proteinoberfläche und der Sorbensoberfläche.  $A_{213}$  ist die Hamaker-Konstante, für das Protein (2) im Lösungsmittel (1), das mit der Oberfläche (3) wechselwirkt. Diese Konstante lässt sich aus den Hamaker-Konstanten der Einzelkomponenten nach

$$A_{213} = \left( \sqrt{A_2} - \sqrt{A_1} \right) \left( \sqrt{A_3} - \sqrt{A_1} \right) \quad (2.1-2)$$

berechnen [14]. Aus Gleichung (2.1-2) lässt sich schließen, dass die Konstante A zwischen zwei identischen Materialien immer positiv ist ( $A_2 = A_3$ ), wobei eine negative Hamaker-Konstante und damit eine repulsive Wechselwirkung erhalten wird, wenn die Konstante  $A_1$  des Lösungsmittels zwischen den Konstanten  $A_2$  und  $A_3$  liegt. Für ein kugelförmiges Protein mit dem Radius  $R = 2 \text{ nm}$ , das mit einer Wasser-Siliziumoxid-Grenzfläche im Abstand  $d = 0.5 \text{ nm}$  wechselwirkt, wurde eine Hamaker-Konstante von  $A_{213} = 1.65 \text{ kT}$  gefunden [15], woraus sich eine Änderung in der Gibbs-Energie von  $\Delta G = -0.62 \text{ kT}$  berechnen lässt, die sich weiter auf  $\Delta G = -4.62 \text{ kT}$  vergrößert, wenn der Abstand auf  $d = 0.1 \text{ nm}$  verringert wird ( $k = \text{Boltzmann-Konstante}$ ,  $T = \text{absolute Temperatur}$ ). Eine idealisierte Geometrie, wie man es bei einer kugelförmigen Gestalt des Proteins annimmt, ist oft nicht gegeben, wodurch der Einfluss der van-der-Waals Wechselwirkung deutlich geringer ausfällt als der berechnete Wert erwarten lässt [16].

Zur Modellierung der Coulomb-Wechselwirkung zwischen einem Proteinmolekül und einer elektrisch geladenen Grenzfläche, kann die Poisson-Gleichung der Elektrostatik herangezogen werden [16,17]:

$$\nabla^2 \psi = -\frac{\rho}{\epsilon_0 \epsilon_r} \quad (2.1-3)$$

wobei  $\Psi$  das elektrische Potential innerhalb eines Raumes ist, der durch die relative Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_r$  ( $\epsilon_0$  = Dielektrizitätskonstante in Vakuum) und die Ladungsdichte  $\rho$  beschrieben wird. Innerhalb des Proteins wird die Ladungsdichte durch die Ladungen der Proteinseitenketten bestimmt, wohingegen die Konzentration der Gegen- und Koionen eine korrespondierende Ladungsdichte in der Elektrolytlösung bildet. Wenn die Verteilung der Ionen einer Boltzmann-Verteilung folgt, ist die Ladungsdichte des Elektrolyten durch

$$\rho_e = \sum_i z_i e c_{i\infty} \exp(-z_i e \Psi_e / kT) \quad (2.1-4)$$

gegeben. Wobei  $z_i$  die Ionenvalenz und  $c_{i\infty}$  die Bulk-Konzentration der Ionensorte  $i$  ist ( $e$  = Elementarladung). Die gekoppelten Poisson-Gleichungen für das Protein und die Elektrolytlösung ergeben das elektrische Potential über das gesamte Volumen, woraus sich die elektrostatische Wechselwirkungsenergie nach Gleichung 2.1-5 berechnen lässt [16, 17]:

$$G = \frac{1}{2} \int_A \sigma \Psi_e dA + \frac{1}{2} \sum_j q_j \Psi_j(r_j) \quad (2.1-5)$$

dabei ist  $\Psi_e$  das elektrische Potential in der Elektrolytlösung und  $\Psi_i$  im Proteininneren,  $\sigma$  die Ladungsdichte der Adsorbensoberfläche und  $q_j$  beschreibt die Ladungen der Proteine  $j$  an den Positionen  $r_j$ . Die Integration verläuft über die Oberfläche  $A$  des Adsorbens und die Summation über alle Proteinladungen  $j$ . Als Beispiel ergibt sich für Lysozym bei pH 7 und einer Oberflächenladungsdichte des Adsorbens von  $-2.2 \mu\text{Ccm}^{-2}$  ( $= -0.14e \text{ nm}^{-2}$ ) eine elektrostatische Wechselwirkungsenergie, je nach Orientierung des Proteins zur Oberfläche, im Bereich von  $-0.8 \text{ kT}$  bis  $-1.9 \text{ kT}$  (die Ionenstärke der Lösung beträgt dabei  $0.1 \text{ M}$ , und der Abstand des Proteins zur Oberfläche ist  $0.766 \text{ nm}$ ) [17].

Eine andere wichtige Triebkraft für die Adsorption von Proteinen sind hydrophobe Wechselwirkungen. Diese beruhen auf der Tendenz hydrophober Moleküle oder hydrophober Molekülbereiche, die Kontaktfläche mit Wassermolekülen zu minimieren. Dies kann zum Beispiel durch Selbstaggregation oder durch Adsorption an hydrophoben Grenzflächen erfolgen. Beispielsweise ist die Änderung der freien Enthalpie für den Transfer von Cyclohexan aus der Bulk- in die wässrige Phase bei 20°C  $+25 \text{ kJmol}^{-1}$  [18]. Da die korrespondierende Transferenthalpie nahe Null ist, muss dieser Prozess mit einer Abnahme der Entropie verbunden sein, die sich mit der Bildung einer geordneten Wasserstruktur (Clathrat-Struktur) um das Cyclohexanmolekül erklären lässt.

Ein Proteinmolekül kann bei Kontakt mit einer Grenzfläche seine Konformation ändern, um die Wechselwirkung mit der Adsorbensoberfläche zu optimieren. Derartige adsorptionsinduzierte Änderungen in der Konformation von Proteinen sind oft beobachtet worden. Diskutiert wird dabei, ob der Verlust der Sekundärstruktur zu einer erhöhten Konformationsentropie des Proteins führen kann [19]. Beispielsweise sinkt der  $\alpha$ -Helix-Anteil von Rinderserumalbumin bei pH = 7 von 74% im nativen Zustand auf 38% nach Adsorption auf einer Glasoberfläche. Geht man von nur zwei Konformationen pro ungefalteten Aminosäurerest aus (etwa 8 Konformationen sind im völlig ungefalteten Zustand eines Proteins möglich) ergibt sich ein Entropie-Gewinn von  $k \ln 2^{10}$ , was einer Gibbs-Adsorptionsenergie von  $-146 \text{ kT}$  entspricht. Auch wenn eine adsorptionsinduzierte Konformationsänderung eines Proteins nicht notwendigerweise mit einer Erhöhung der Rotationsfreiheitsgrade der Aminosäurereste verbunden ist, zeigt dieses Beispiel, dass ein teilweises Entfalten des Proteins an der Oberfläche eine der stärksten Triebkräfte für die Proteinadsorption darstellen kann.

Ein Vergleich der Gibbs-Entfaltungsenergien zum Adsorptionsverhalten von Proteinen unterstützen diese Annahme [19, 20].  $\alpha$ -Lactalbumin beispielsweise, das eine vergleichsweise geringe Gibbs-Entfaltungsenergie von  $18 \text{ kJ/mol}$  [21] besitzt, adsorbiert auf hydrophilem  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  sogar unter elektrostatischer Abstoßung. Dagegen adsorbiert Lysozym, ein deutlich stabileres Protein mit

einer Gibbs-Entfaltungsenergie von 37 kJ/mol [21], auf der gleichen Oberfläche nur bei elektrostatischer Anziehung.

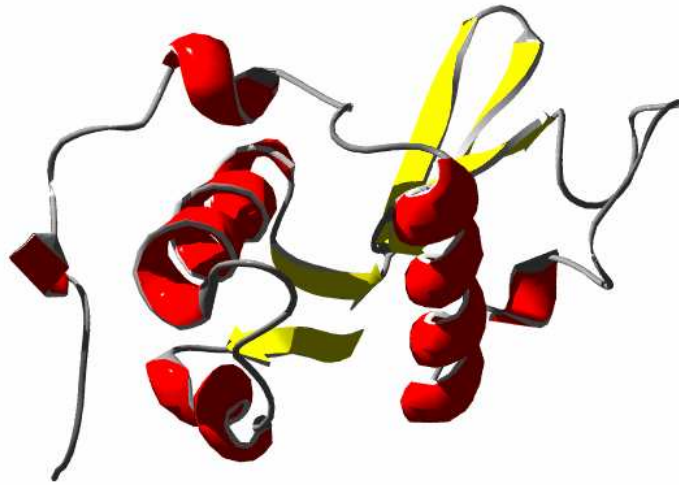
## **2.2 Struktureigenschaften der untersuchten Proteine**

Im Folgenden sind die strukturellen Eigenheiten der untersuchten Proteine aufgeführt. Andere, für die Proteinadsorption maßgebliche Eigenschaften, wie Molekulargewicht, isoelektrischer Punkt und Gibbs-Entfaltungsenergie sind am Ende des Abschnitts zusammengefasst tabelliert.

### **2.2.1 $\alpha$ -Lactalbumin**

Natürliches  $\alpha$ -Lactalbumin besteht aus zwei Domänen: einer großen  $\alpha$ -helikalen und einer kleineren  $\beta$ -Faltblatt-Domäne, die über eine Kalzium-Bindungstelle miteinander verbunden sind (Abb. 2.2-1). Die  $\alpha$ -helikale Domäne besteht aus drei großen  $\alpha$ -Helices und zwei kurzen  $3_{10}$ -Helices. Die kleinere Domäne setzt sich aus einer dreisträngigen, antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt-Struktur und einer kurzen  $3_{10}$ -Helix zusammen. Insgesamt wird die Struktur von  $\alpha$ -LA von vier Disulfidbrücken stabilisiert.





*Abb. 2.2-1* Bänderdiagramm von  $\alpha$ -Lactalbumin. Erstellt mit POV-Ray, Version 3.6 [22], Datensatz 1ALC [23] aus der Brookhaven-Proteindatenbank [24].

### 2.2.2 Lysozym

Die Primärsequenz von Lysozym verläuft homolog zu der von  $\alpha$ -LA. Röntgenkristallographische Messungen haben gezeigt, dass auch die Tertiärstruktur sehr ähnlich ist [25, 26]. Die globuläre Gestalt hat eine Größe von  $3 \times 3 \times 4.5 \text{ nm}^3$  [18, 27]. Es liegen drei  $\alpha$ -Helices, drei  $3_{10}$ -Helices und vier  $\beta$ -Faltblättern vor (s. Abb. 2.2-2). Wie schon zuvor bei  $\alpha$ -LA wird auch bei Lysozym die Gesamtstruktur von vier Disulfidbrücken zwischen Cystein-Seitenketten stabilisiert.

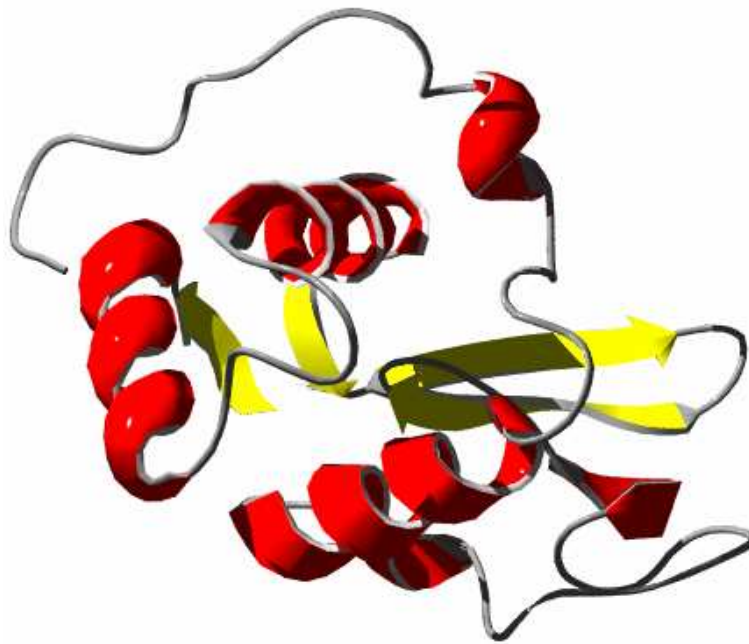
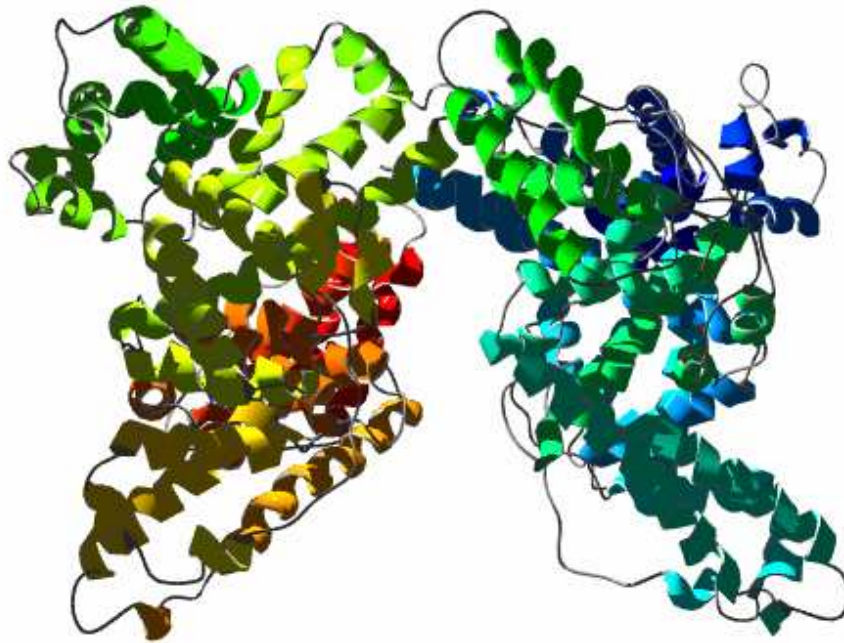


Abb. 2.2-2 Bänderdiagramm von Lysozym. Erstellt mit POV-Ray, Version 3.6 [22], Datensatz 133L [28] aus der Brookhaven-Proteindatenbank [24].

### 2.2.3 Serumalbumin

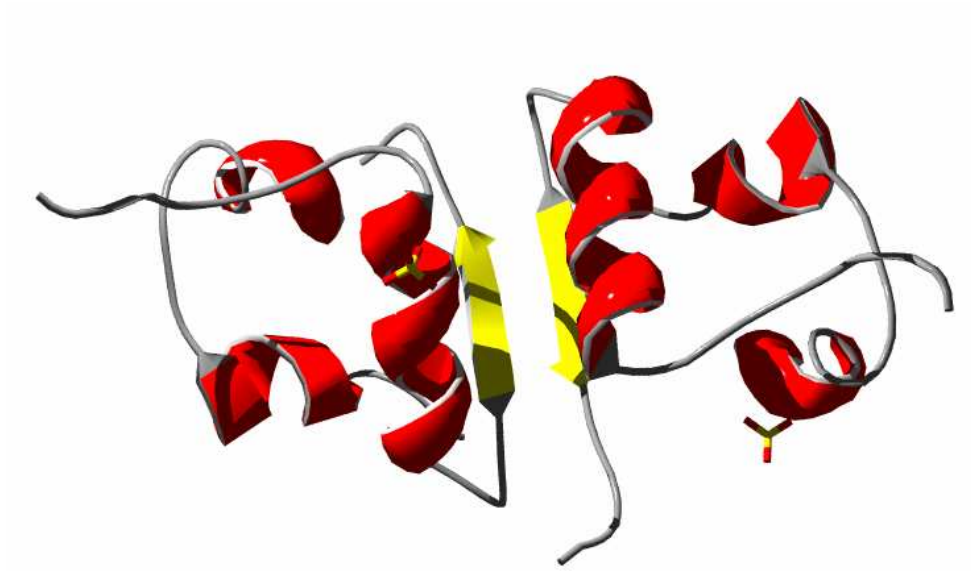
Rinderserumalbumin (BSA) besteht aus einer einzigen Peptidkette, die zu etwa 65%  $\alpha$ -helikale Form und keinen  $\beta$ -Faltblattanteil besitzt [29]. Es hat die Struktur eines gleichseitigen Dreiecks mit einer Seitenlänge von annähernd 80 Å und einer Tiefe von nahezu 30 Å [30]. Die dreidimensionale Struktur setzt sich zusammen aus drei homogenen Bereichen, die jeweils in zwei weitere Unterbereiche eingeteilt werden können. Die Unterbereiche besitzen größtenteils helikale Struktur und sind über einige Disulfidbrücken stark miteinander vernetzt. Alle Disulfidbindungen sind für reduzierende Reagenzien im pH Bereich von 5-7 nicht erreichbar und müssen demnach gut vom Lösungsmittel abgeschirmt sein [32].



*Abb. 2.2-3* Bänderdiagramm von menschlichem Serumalbumin (HSA).  
Erstellt mit POV-Ray, Version 3.6 [22], Datensatz 1bm0 [33] aus der  
Brookhaven-Proteindatenbank [24]

#### 2.2.4 Insulin

Insulin besteht aus zwei Peptidketten, die als A- und B-Kette bezeichnet werden. Die beiden Ketten sind über zwei Disulfidbindungen miteinander verbunden, wobei eine weitere Disulfidbrücke innerhalb der A-Kette existiert. Bei den meisten Spezies bestehen die A-Kette aus 21 Aminosäuren und die B-Kette aus 30 Aminosäuren. Insulinmoleküle haben aufgrund einer Wasserstoffbindung zwischen den C-Termini der B-Ketten die Tendenz in Lösung zu dimerisieren. Bei pH 2 liegt es hauptsächlich als Dimer (Abb. 2.2-4) und bei pH 7 als Hexamer vor (Abb. 2.2-5).



*Abb. 2.2-4* Bänderdiagramm eines Insulindimers bei pH 2.0. Erstellt mit POVRAY, Version 3.6 [22], Datensatz 1guj [34] aus der Brookhaven-Proteindatenbank [24]



Abb. 2.2-5 Bänderdiagramm eines Insulinhexamers bei pH 7.0. Erstellt mit POV-Ray, Version 3.6 [21], Datensatz 1AI0 [33] aus der Brookhaven-Proteindatenbank [23]

### 2.2.5 Vergleich der für die Proteinadsorption relevanten Proteineigenschaften

Protein	Molekulargewicht [Dalton]	isoelektrischer Punkt	Entfaltungsentnergie [kJmol <sup>-1</sup> ]
Lysozym	14 388	11.1 [98]	37 [21]
$\alpha$ -La	14 176	4.5 [96]	18 [21]
BSA	66 300	4.6 [88]	18 [88]
Insulin	5 808	5.3 [97]	19 [99]

### 3 Methodenteil

#### 3.1 Absorptionsspektroskopie [35]

##### 3.1.1 Das Übergangsdipolmoment

Molekülbestandteile die zur Absorption von Photonen fähig sind, werden Chromophore (griech. Farbträger) genannt. Die Ladungsverteilung im Chromophor bestimmt sein Dipolmoment  $\vec{\mu}_{el}$ , das sich nach Absorption eines Elektrons ändert. Ein Maß für die Wahrscheinlichkeit eines elektronischen Übergangs durch Absorption eines Photons ist das Übergangsdipolmoment  $\vec{\mu}_{el}$ . Es lässt sich mit Hilfe einer quantenmechanischen Störungsrechnung aus den Wellenfunktionen  $\Psi_1, \Psi_2$  von Grund- und angeregtem Zustand berechnen. Dem Quadrat des Übergangsdipolmoments ist die dimensionslose Oszillatorenstärke  $f_{21}$  proportional:

$$f_{21} = \text{konst.} \cdot |\vec{\mu}_{21}^{el}|^2 \quad (3.1-1)$$

Bei einem erlaubten Übergang hat die Konstante den Wert eins. Die Oszillatorenstärke ist der Fläche unter dem frequenzabhängigen Absorptionsspektrum proportional und kann hieraus nach Gl. 3.1-2 berechnet werden:

$$f_{21} = \frac{4\epsilon_0 m_e c^2 \ln 10}{N_A e^2} \cdot \int_{\text{Bande}} \epsilon(\nu) d\nu \quad (3.1-2)$$

mit  $\epsilon_0$  = elektrische Feldkonstante,  $m_e$  = Masse Elektron,  $c$  = Lichtgeschwindigkeit,  $N_A$  = Avogadro-Konstante,  $e$  = Elementarladung und  $\epsilon(\nu)$  = Extinktionskoeffizient.

Es werden i. Allg. breite Absorptionsbanden beobachtet, da neben der elektronischen Anregung auch Molekülschwingungen angeregt werden. Für Molekül-

schwingungen lässt sich eine anharmonische Potentialkurve als Funktion des Kernabstandes annehmen (Abb. 3.1.1), wobei der Gleichgewichtsabstand  $r_1$  im angeregten Zustand  $S_1$  meist etwas größer ist als der des Grundzustandes  $r_0$ . Jeder elektronische Zustand besitzt Schwingungszustände  $v$ , die durch die Schwingungsquantenzahlen  $v$  und die Eigenfunktionen charakterisiert sind. Aus dem Quadrat der Eigenfunktion erhält man die Verteilung der Aufenthaltswahrscheinlichkeit des schwingenden Teilchens.

Die Absorption eines Lichtquants erfolgt sehr schnell ( $\tau_a = 10^{-15}\text{s}$ ), der Kernabstand bleibt in diesem Zeitraum nahezu konstant, da die Dauer einer Schwingung etwa  $10^{-13}\text{s}$  beträgt. Daraus folgt, dass die Anregung vom elektronischen Grundzustand  $S_0$  in den ersten angeregten Zustand  $S_1$  senkrecht erfolgt (Franck-Condon-Prinzip).

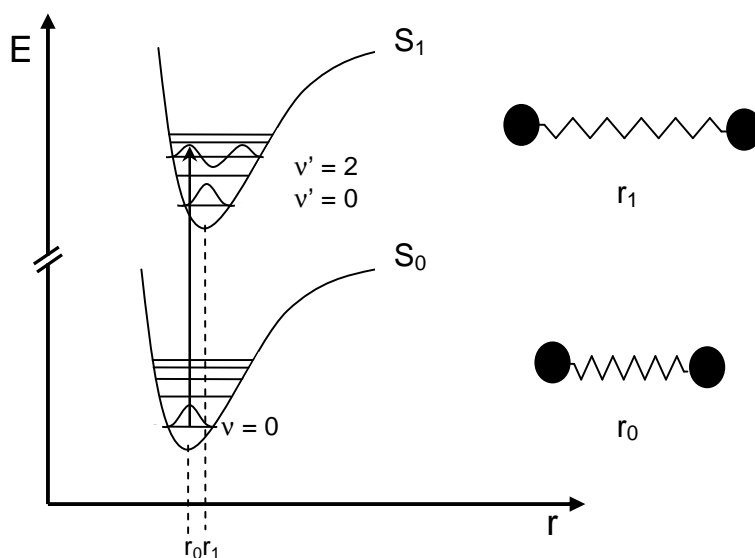


Abb. 3.1-1 Der Übergang  $S_0(v=0) \rightarrow S_1(v'=2)$  ist am wahrscheinlichsten, da die Maxima der Wellenfunktionen überlappen. Die Anregung eines Elektrons in ein antibindendes Orbital schwächt die Atombindung, weshalb sich der Gleichgewichtsabstand  $r$  vergrößert.

Überlappen sich die Wellenfunktionen  $\Psi_v$  der Schwingungen des elektronischen Grund- und angeregten Zustands, kommt es zur Absorption von Strahlung, die

umso intensiver ausfällt, je besser beide Funktionen überlappen. Als Maß für die Größe der Überlappung dient der so genannte Frank-Condon-Faktor, der sich aus dem Überlappungsintegral der beiden Wellenfunktionen berechnen lässt.

### 3.1.2 Das Lambert-Beersche Gesetz

Die eingestrahlte Lichtintensität  $I_0$  klingt bei Anwesenheit einer absorbierenden Substanz mit der Weglänge  $d$  exponentiell ab. Daraus folgt für die transmittierte Lichtintensität  $I$ :

$$I = I_0 \cdot e^{-\alpha \cdot d} \quad (3.1-3)$$

mit  $\alpha = \alpha(\lambda)$  als materialspezifischer Absorptionskoeffizient.

In verdünnten Lösungen ( $c < 0,01 \text{ M}$ ) wird mit Einführung des molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  und der Konzentration  $c$  der absorbierenden Teilchen  $\alpha$  zu

$$\alpha = 2,303 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (3.1-4)$$

Einsetzen in Gl. 3.1-3 liefert das Lambert-Beersche Gesetz:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot d} \quad (3.1-5)$$

Der (molare) dekadische Extinktionskoeffizient  $\varepsilon(\lambda)$  ist wellenlängenabhängig und beschreibt die Absorptionsfähigkeit eines Chromophors. Seine Größe hängt damit von seinem Übergangsdipolmoment ab.



Mit Einführung der Extinktion  $E = \log \frac{I_0}{I}$  (3.1-6) und nach Logarithmierung des Lambert-Beerschen Gesetzes (3.1-5) folgt

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (3.1-7)$$

### 3.2 Fluoreszenzspektroskopie

Nach Absorption eines Photons kann ein Molekül die aufgenommene Energie auf unterschiedlichen Wegen wieder freisetzen, die möglichen Relaxationskanäle lassen sich in Form eines Jablonski-Diagramms zusammenfassen (Abb. 3.2-1). Vor der Anregung befindet sich das Molekül im Schwingungsgrundzustand  $S_0$  ( $v = 0$ ) des elektronischen Grundzustandes. Durch Lichtabsorption (A) gelangt der Fluorophor in verschiedene Schwingungszustände  $v'$  des ersten elektronisch angeregten Zustands  $S_1$  (oder auch in höher gelegene Zustände  $S_2$  usw.). Dabei ist der Übergang umso wahrscheinlicher, je größer der Franck-Condon-Faktor für den Übergang ist. Durch Stöße mit umgebenden Molekülen gibt das angeregte Molekül einen Teil der Absorptionsenergie in Form von Schwingungsenergie an seine Umgebung ab, was als innere Umwandlung bezeichnet wird (engl.: Internal Conversion, IC). Die Zeit für diesen Prozess ist von der Anzahl der Stöße pro Zeiteinheit, der so genannten Stoßzahl, abhängig. Bei Wassermolekülen ist sie im Bereich von  $10^{11}$  -  $10^{12}$  Stößen pro Sekunde, woraus sich eine Schwingungsrelaxationskonstante von  $10^{-11}$ s ableiten lässt. Nach Relaxation in den  $S_1$  ( $v'=0$ )-Zustand kann das Molekül erneut durch innere Umwandlung in den Grundzustand übergehen, da jedoch die Energiedifferenz zwischen angeregtem und Grundzustand verhältnismäßig groß ist, erfolgt sie deutlich langsamer [35].

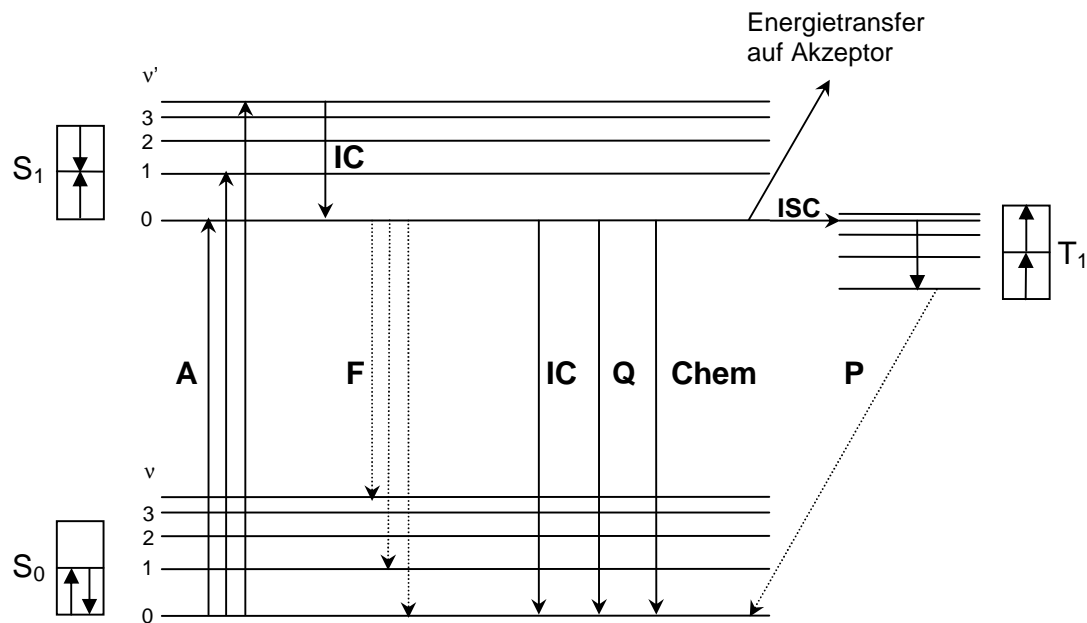


Abb. 3.2-1 Mögliche Relaxationsprozesse eines Fluorophors nach Absorption eines Photons gezeigt anhand eines Energieniveauschemas (Jablonski-Diagramm). Der Grundzustand  $S_0$  besitzt Elektronen mit entgegengesetztem Spin. Bei Anregung in die nächst höheren elektronischen Zustände gibt es die Möglichkeit, dass die Spins ihre entgegengesetzte Orientierung beibehalten (Singulett-Zustand  $S_1$ ) oder aber aufgrund inter- oder intramolekularer Wechselwirkung eine parallele Orientierung in unterschiedlichen Energieniveaus annehmen Triplett-Zustand ( $T_1$ ) [35].

Die Geschwindigkeitskonstante für diesen Prozess ist etwa so groß wie die für die Fluoreszenz, die Werte im Bereich von  $k_F = 10^8 \text{ s}^{-1}$  annimmt. Der Prozess der Fluoreszenz (F) geht vom  $S_1$  ( $v' = 0$ ) - Niveau aus und kann beim Übergang in die höheren Schwingungsniveaus des elektronischen Grundzustands gelangen. Da die Energiedifferenz des Übergangs kleiner ist als bei der Absorption, ist das Fluoreszenzlicht gegenüber dem absorbierten Licht energieärmer und deshalb rotverschoben.

Ein weiterer Konkurrenzprozess zur Fluoreszenz ist die Energieübertragung auf ein benachbartes Molekül, z.B. durch Stoß, wobei die Emission von Licht unterbleibt; man sagt, die Fluoreszenz wird gelöscht. Der angeregte Fluorophor  $X^*$  geht dabei kurzfristig einen Stoßkomplex mit dem Quenchpartner Q ein [36].

Damit es jedoch zur Bildung eines Stoßkomplexes zwischen angeregtem Fluorophor und Quencher kommt, müssen beide während der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_F = k_F^{-1}$ , also innerhalb von  $10^{-8}$  s, miteinander stoßen. Ihr Abstand darf somit einen gewissen Wert nicht überschreiten.

In Lösung bewegen sich die beiden Moleküle nicht direkt aufeinander zu, sondern legen aufgrund der vielen Stöße (BROWNsche Molekularbewegung) einen komplizierten Weg zurück. Setzt man in  $\langle x^2 \rangle = 2 D t$  für die Zeit  $t$  die mittlere Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_F$  und für den Diffusionskoeffizienten  $D$  eines kleineren Moleküls  $D = 5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  ein, erhält man für den im Mittel zurückgelegten Weg innerhalb der Fluoreszenzlebensdauer etwa 5 nm. Wird die Quencherkonzentration so groß gewählt, dass im Mittel der Abstand zwischen Fluorophor und Quencher diesem Wert entspricht, kann die Fluoreszenz gelöscht werden.

Eine weitere Möglichkeit der Desaktivierung ist der Singulett-Singulett-Energietransfer, auch FÖRSTER-Transfer genannt. Bei diesem Prozess wird die Energie von dem angeregten Fluorophor  $X^*$  auf ein anderes Teilchen Y übertragen ( $X^* + Y \rightarrow X + Y^*$ ). Mit Hilfe dieses Effektes lässt sich der Abstand zwischen Fluorophoren bestimmen [36].

Beim Interkombinationsübergang (engl.: Intersystem Crossing, ISC) gelangt der angeregte Fluorophor durch Spinumkehr strahlungslos in höhere Schwingungszustände des elektronischen Triplettzustandes  $T_1$ . Streng genommen ist dieser Übergang in einfacher Näherung quantenmechanisch verboten, bei geringen Energiedifferenzen zwischen  $T_1$  - und  $S_1$  - Zuständen kann er jedoch in deutlichem Maß stattfinden ( $k_{ISC} \approx 10^8 \text{ s}^{-1}$ ). Durch IC wird auch dort der Schwingungsgrundzustand erreicht. Die erneute Spinumkehr in den  $S_0$ -Grundzustand ist wiederum verboten, so dass Relaxation in den Singulett-Grundzustand  $S_0$  langsam erfolgt. Dieser Übergang ist wiederum mit Lichtemission

verbunden, der so genannten Phosphoreszenz P. Ihre Geschwindigkeitskonstante liegt im Bereich von  $10^{-2}$  bis  $10^2 \text{ s}^{-1}$ . Da der  $T_1$ -Zustand energieärmer ist als der  $S_1$ -Zustand, erscheint Phosphoreszenzlicht gegenüber Fluoreszenzlicht rotverschoben [36].

Als letzter Relaxationskanal sei schließlich noch die Ausnutzung des Anregungslichtes für chemische Reaktionen (Chem) genannt, wie es zum Beispiel bei der ersten Stufe im Sehprozess oder bei der Photosynthese stattfindet [35].

### 3.2.1 Messmethoden in der Fluoreszenzspektroskopie

Aus der Messung der Fluoreszenzstrahlung eines Moleküls lassen sich Aussagen über die Eigenschaften des angeregten Chromophors (Fluorophors) und seiner Umgebung innerhalb der Lebensdauer von etwa  $10^{-8} \text{ s}$  erhalten. Dabei können folgende Prozesse eine Rolle spielen und untersucht werden:

- Stoßprozesse, d.h. Quenchen oder Excimerbildung
- Energietransfer
- Lösungsmittelrelaxation
- Chromophorrotation

Die Untersuchung dieser Prozesse kann wertvolle Hinweise auf die Umgebung und die Dynamik des Fluorophors, welche meist Bestandteil eines größeren Biomoleküls ist, geben. Hierzu werden die folgenden Messverfahren eingesetzt.

#### 3.2.1.1 Statische Fluoreszenzmessungen

Mit einem Fluorometer wird die Fluoreszenzstrahlung statisch gemessen. Dabei wird kontinuierlich monochromatisches Licht, welches – falls gewünscht – auch

polarisiert werden kann, in eine Probe eingestrahlt. Senkrecht zur Anregungs-Strahlung wird die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichtes, ebenfalls wellenlängen- und bedingungsweise polarisationsabhängig, mit einem Photomultiplier detektiert. Gleichzeitig kann die Absorption der Probe gemessen werden. Messgrößen sind somit die Fluoreszenzintensität  $I_F$ , die Intensität des absorbierten Lichtes  $I_A$  bzw. die Extinktion  $E$ , die Quantenausbeute  $\Phi$  der Fluoreszenz (das Verhältnis von emittiertem zu absorbiertem Licht,  $\Phi = I_F / I_A$ ) sowie Polarisierungseffekte. Eine lineare Abhängigkeit von Fluoreszenz- zu Absorptionsintensität ist nur für ausreichend verdünnte Proben mit Extinktionen bis etwa  $E = 0.05$  gegeben. Die Fluoreszenzintensität ist i. Allg. stark temperaturabhängig, da der Beitrag der strahlungslosen Relaxationsprozesse mit zunehmender Temperatur größer wird [36].

#### 3.2.1.2 Dynamische Fluoreszenzmessung

Die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie gestattet es, schnelle Reaktionen und Bewegungen im  $\mu\text{s}$ - bis  $\text{ps}$ -Bereich zu studieren. Untersuchungen der Abklingzeiten angeregter elektronischer Zustände von Fluorophormolekülen, die durch Resonanzenergietransfer, Lösungsmittelrelaxation, dynamisches Quenching, Protonen-Transfer oder Rotationsdiffusion bedingt sind, können detaillierte Informationen über die Dynamik und Struktur des Fluorophors und seine Umgebung liefern. Die Entwicklung zeitaufgelöster Fluoreszenzspektrometer für die Untersuchung dynamischer Eigenschaften von Membranen und Proteinen wurde in den letzten Jahren wesentlich vorangetrieben. Dabei konnte die Messgenauigkeit im Nano- bis Pikosekundenbereich durch den Einsatz von  $\text{ps}$ -Farbstofflasern mit hoher Repititionsrate und entsprechend schnellen Detektoren erheblich verbessert werden. Zwei Arten von Techniken werden eingesetzt: Die Puls- bzw. Zeitdomänentechnik und die Phasenmodulations- bzw. Frequenzdomänentechnik. Die Zeitdomänentechnik (s. Abb.3.2-3) wird in der Regel mit Hilfe der *single photon counting* - Messmethode durchgeführt, bei der mit einer

gepulsten Lichtquelle – einer Nanosekunden-Blitzlampe, einem Laser oder mit einer Synchrotronquelle – gearbeitet wird [36].

Die zweite Messmethode, die eines Phasenfluorometers, beruht auf der Amplituden- und Phasenbeziehung zwischen anregendem und emittiertem Licht. Hauptunterschied zur Zeitdomänentechnik ist die kontinuierliche Bestrahlung der Probe durch Licht, welches in seiner Intensität sinusförmig moduliert wird, typischerweise im Bereich von 0-300 MHz. Die Fluoreszenzantwort ist entsprechend der Anregung mit derselben Frequenz  $\omega$  moduliert, jedoch aufgrund der endlichen Lebensdauer des angeregten elektronischen Zustandes verzögert, d.h. im Vergleich zur Anregungsfrequenz zeitlich verschoben (mit Phasenverschiebung  $\phi$ ), und die Intensitätsamplitude ist demoduliert (s. Abb. 3.2-4). Phasenverschiebung und Demodulationsgrad werden üblicherweise bei mehreren Frequenzen gemessen.

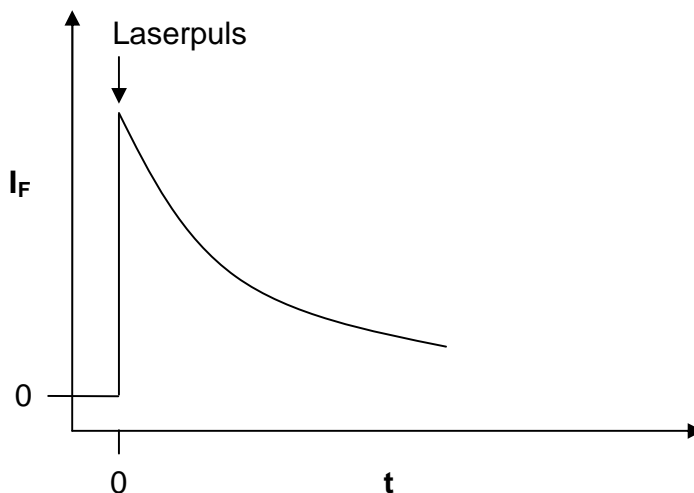


Abb.3.2-3 Schematische Darstellung der Intensitätsabnahme des Fluoreszenzlichtes  $I_F$  als Funktion der Zeit  $t$  nach Anregung der Probe mit einem Laserlichtpuls zum Zeitpunkt  $t = 0$ . Aus ihr lässt sich die Lebensdauer  $\tau_F$  des angeregten elektronischen Zustandes bestimmen.

Der Demodulationsgrad  $m$  (Abb. 3.2-4) des emittierten Lichtes ändert sich, da nicht alle angeregten Fluorophore gleichzeitig in den elektronischen Grund-

zustand übergehen. Aus beiden Größen lässt sich die Lebensdauer  $\tau$  des angeregten Zustandes bestimmen:

$$\tan \phi = \omega \tau_{\phi} \quad (3.2-4)$$

$$m = \frac{A_F / O_F}{A_A / O_A} = \frac{1}{(1 + \omega^2 \tau_m^2)^{1/2}} \quad (3.2-5)$$

mit  $\omega = 2\pi\nu$  Modulationsfrequenz; A = Amplitude, O = offset,  $\tau_F = \tau_{\phi} = \tau_m$  für eine einzige fluoreszierende Spezies.

Für jede Modulationsfrequenz wird die Phasenverschiebung  $\phi$  und der Demodulationsgrad m bestimmt. Die Phasenverschiebung wird in Winkелеinheiten angegeben. Sie nimmt mit zunehmender Modulationsfrequenz von  $0^\circ$  auf  $90^\circ$  zu. Der Demodulationsgrad ist dimensionslos und nimmt mit zunehmender Frequenz von maximal 1 (vollkommen moduliertes Fluoreszenzlicht) auf minimal 0 (völlig demoduliertes Fluoreszenzlicht) ab. Liegt ein komplexer zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzstrahlung vor, z.B. wenn mehrere Fluorophore Strahlung emittieren, ist  $\tau_{\phi} < \tau_m$ . Durch Variation der Modulationsfrequenz lassen sich mit dieser Methode die einzelnen fluoreszierenden Komponenten nebeneinander bestimmen.

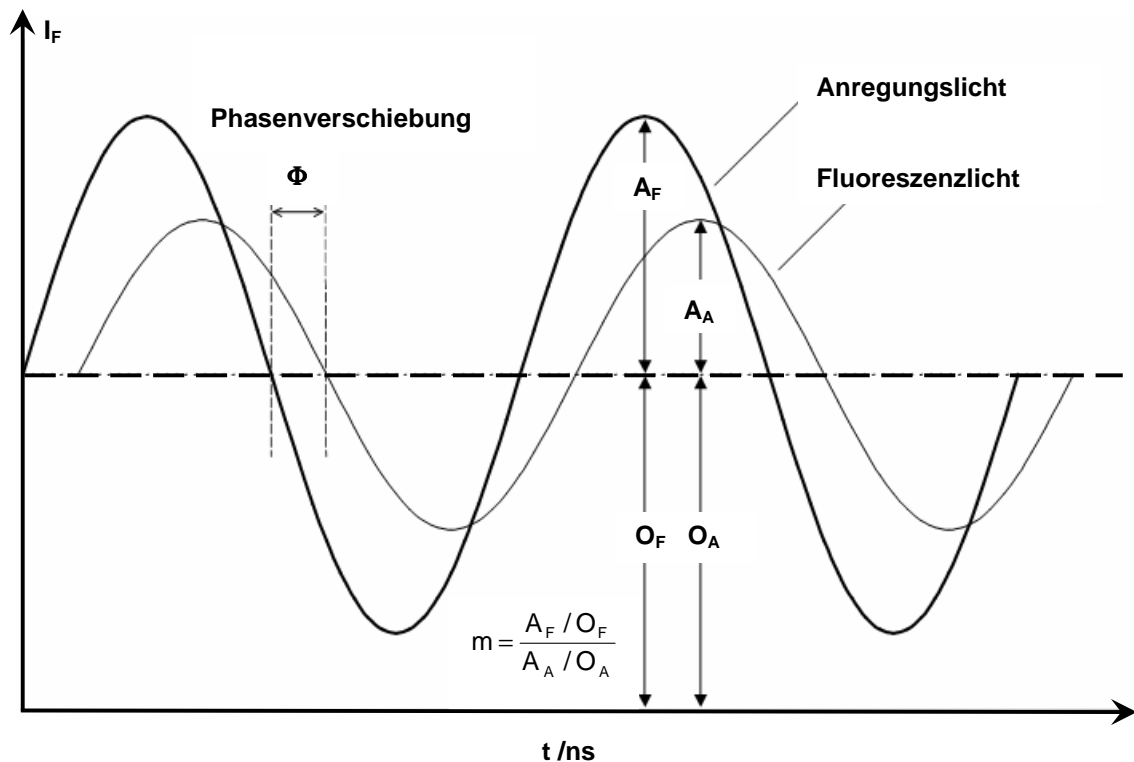


Abb. 3.2-4 Frequenzantwort der Fluoreszenzstrahlung auf eine Anregung mit der Kreisfrequenz  $\omega$  in einem Phasenfluorometer (Frequenzdomänentechnik). Zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer mittels modulierten Anregungslichts (Lichtwelle mit großer Amplitude  $A_A$ , offset  $O_A$ ) wird die Phasenverschiebung  $\Phi$  oder der Demodulationsgrad  $m$  ermittelt. Das phasenverschobene Fluoreszenzlicht besitzt eine kleinere Modulation ( $A_F / O_F$ ).

### 3.2.1.3 total internal reflection fluorescence (TIRF)-Fluoreszenzspektroskopie

Im Rahmen dieses Projektes diente die TIRF-Spektroskopie sowohl zur Ermittlung des Adsorptionsgrades von Proteinen an Polymeroberflächen unter verschiedenen Bedingungen als auch zur Bestimmung der Dynamik adsorbierter Proteinmoleküle. Für die dynamischen Messungen wurde die Intensität der Proteinfluoreszenz zeitaufgelöst mit einem Multifrequenz-Phasenfluorometer gemessen.



Das Messprinzip der TIRF-Spektroskopie beruht auf einer Totalreflexion von Licht innerhalb eines Quarzprismas an einer Grenzfläche (Abb. 3.2-5) [5].

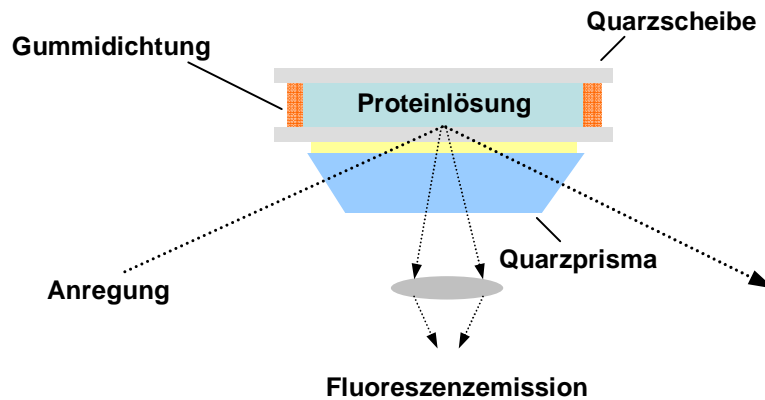


Abb. 3.2-5 TIRF-Probenzelle und Geometrie der Proteinanregung und Fluoreszenzemission

Das Quarzprisma wird über eine Flüssigkeitsschicht mit gleichem Brechungsindex optisch an eine Quarzscheibe gekoppelt. Die Proteinadsorption findet dadurch nicht direkt am Prisma statt sondern an der Quarzscheibe, die z.B. mit Polyacrylsäurebürsten modifiziert ist und bei Bedarf ausgetauscht werden können. Die Überlagerung des einfallenden und des reflektierten Lichtstrahls führt zur Ausbildung einer stehenden Welle der elektrischen Feldkomponente des Lichtes im Quarzglas (Abb. 3.2-6). Aufgrund eines endlichen Wertes des elektrischen Feldes an der Grenzfläche dringt eine exponentiell abfallende (evaneszente) Welle in die Proteinlösung ein, deren Amplitude mit folgender Gleichung beschrieben wird [5]:

$$E = E_0 \exp(-z / d) \quad (3.2-6)$$

Hierin ist  $E_0$  die Amplitude des elektrischen Feldes an der Grenzfläche,  $z$  der Abstand von der Grenzfläche in die Proteinlösung hinein und  $d$  die Eindringtiefe der Welle, gegeben durch

$$d = \frac{\lambda_0}{2\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_1 - n_2^2}} \quad (3.2-7)$$

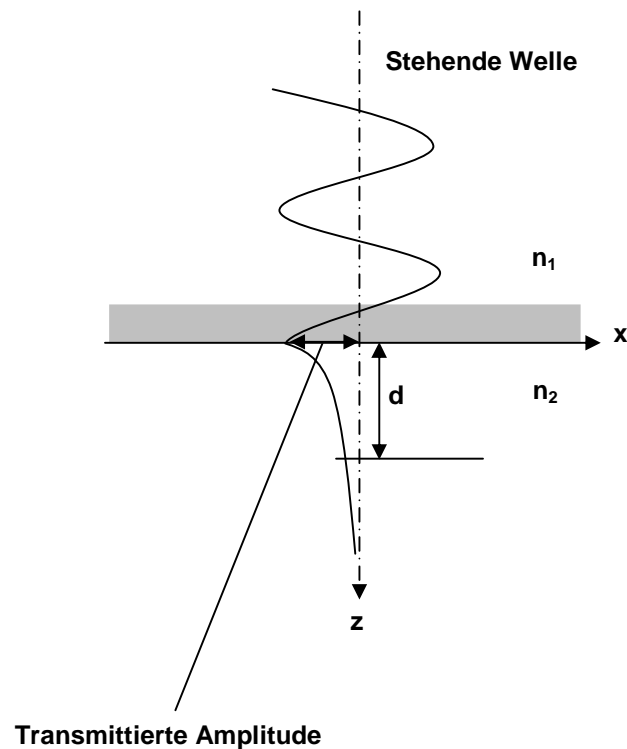


Abb.3.2-6 Ausbildung einer stehenden Welle bei Totalreflexion an einer Grenzfläche. Das elektrische Feld an der Grenzfläche dringt exponentiell abfallend (evaneszent) in das darunter liegende Medium ein ( $n_1 > n_2$ ).

Die Eindringtiefe des elektrischen Feldes in die Lösung durch eine Totalreflexion von Licht im Glas hängt damit von der Vakuumwellenlänge  $\lambda_0$  des Lichts, von den Brechungsindices  $n_1$  des Glases und  $n_2$  der Lösung sowie vom Einfallswinkel  $\theta_1$  des Lichts ab. Für typische Werte von  $\lambda_0 = 295\text{nm}$ ,  $n_1 = 1.489$ ,  $n_2 = 1.360$  und  $\theta_1 = 70^\circ$ , folgt eine Eindringtiefe von  $d = 143\text{ nm}$ . Da mit werden nur diejenigen Proteinmoleküle angeregt, die sich nahe der Substratoberfläche bzw. im adsorbierten Zustand befinden. Im Fall verdünnter Proteinlösungen wird

das Fluoreszenzsignal vom Proteinadsorbat dominiert und kann deshalb für eine Analyse von adsorbierten Proteinmolekülen herangezogen werden. Liegt beispielsweise eine Lysozymlösung der Konzentration  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  vor und beträgt die Grenzflächenkonzentration  $2 \text{ mg m}^{-2}$ , stammen mehr als 99% aller angeregten Lysozymmoleküle von der Grenzfläche. Bei den TIRF - Adsorptionsexperimenten an einer Polyacrylsäurebürste war die folgende experimentelle Besonderheit zu beachten. Die Quarzscheiben wurden mit einem dünnen Polystyrolfilm beschichtet. Polystyrol hat einen geringfügig größeren Brechungsindex als Quarz, so dass die Totalreflexion des Lichts erst an der Grenzfläche Polystyrol / Proteinlösung stattfindet. Die Dicke der Polyacrylsäurebürste war durch die Polyacrylsäure-Kettenlänge vorgegeben und beträgt gestreckt bei niedrigen Ionenstärken etwa 140 nm, wodurch garantiert ist, dass das Feld der evaneszenten Welle nur solche Proteinmoleküle anregen kann, die sich innerhalb der Polyacrylsäurebürste befinden.

#### 3.2.1.4 Struktur und Dynamik eines Proteins [13]

Zum Fluoreszenzspektrum eines Proteins können drei Aminosäurereste beitragen: Phenylalanin, (Phe, F), Tyrosin (Tyr, Y), und Tryptophan (Trp, W) [36], wovon Tryptophan die Fluoreszenz dominiert. Es absorbiert Licht bei der längsten Wellenlänge und hat den größten Extinktionskoeffizient. Die Tryptophan-Fluoreszenz eines Proteins kann selektiv im Bereich von 295-300 nm angeregt werden. Die Fluoreszenzbande lässt sich über die Region von 300 – 450 nm beobachten. Interessanterweise ist das Emissionsmaximum von Tryptophan abhängig von der Polarität der Umgebung: Während das Maximum der Fluoreszenzintensität in einer hydrophoben Umgebung bei 330 nm liegt, ist das Maximum in wässriger Lösung zu 350 nm hin rotverschoben. Dieser Lösemittel-effekt lässt sich mit einer Relaxation der Lösemittelmoleküle, die den Fluorophor während der Lebenszeit des angeregten Zustands von typischerweise 1-10 ns umgeben, erklären. Da das Dipolmoment des Fluorophors im angeregten

Zustand gewöhnlich größer ist, reorientieren sich die Lösemittelmoleküle, um die Energie des angeregten Zustands zu verkleinern. Als Folge vergrößert sich die Wellenlänge der Fluoreszenz. Eine Änderung der Emissionswellenlänge eines Proteins kann genutzt werden, um Veränderungen in der Konformation des Proteins zu detektieren. Hält sich ein Tryptophanrest in einem hydrophoben Innenbereich des Proteins auf, findet die Fluoreszenzemission bei kurzen Wellenlängen statt. Ein Entfalten des Proteins aufgrund von Hitzeeinwirkung oder Denaturantien, führt dazu, dass der Tryptophanrest Wassermolekülen ausgesetzt wird, und dadurch die Fluoreszenzemission rotverschoben ist. Andere Fluorophore als Tryptophan können ebenfalls ein polaritätsabhängiges Fluoreszenzemissionsspektrum zeigen und werden deshalb als extrinsische Proteinfluorophore eingesetzt. Das Fluoreszenzemissionsspektrum einer Dansyl-Gruppe ist beispielsweise etwa 100 nm rotverschoben, wenn sich die Umgebung von hydrophob zu wässrig ändert.

Um die Gesamttotation und die interne Dynamik eines Proteinmoleküls zu studieren, kann die Fluoreszenzanisotropie eines Proteins als Funktion der Zeit gemessen werden [36]. Die Fluoreszenzanisotropie ist definiert als:

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}} \quad (3.2-8)$$

dabei ist  $I_{||}$  die Fluoreszenzintensität, die mit vertikal polarisierten Anregungs- und Emissionslicht erhalten wurde, und  $I_{\perp}$  entspricht der Fluoreszenzintensität, die mit vertikal und horizontal polarisiertem Anregungs- und Emissionslicht gemessen wurde. Die Anisotropie wird auf die Gesamtemission normalisiert  $I_{\text{ges}} = I_{||} + 2I_{\perp}$ . Zur Auswertung der Daten kann die Summe von zwei Exponentialfunktionen verwendet werden, um die zeitabhängige Anisotropie der Tryptophan-Fluoreszenz zu beschreiben:

$$r(t) = r_0 \left[ g_1 \exp\left(\frac{-t}{\theta_1}\right) + g_2 \exp\left(\frac{-t}{\theta_2}\right) \right] \quad (3.2-9)$$

$r_0$  ist hierbei die maximale Anisotropie auf der Zeitskala der Fluoreszenzexperimente,  $\theta_1$  und  $\theta_2$  sind Rotationskorrelationszeiten von Tryptophan, und  $g_1$  bzw.  $g_2$  sind die jeweiligen Anteile der Amplituden ( $g_1 + g_2 = 1$ ). In Abwesenheit jeglicher Depolarisation des Anregungslichtes würde man nach Gleichung 3.2-8 eine Anisotropie von 1 erwarten ( $I_{\perp} = 0$ ). Es gibt jedoch unmittelbare Depolarisationseffekte, die in der maximalen Anisotropie  $r_0$  enthalten sind: Da die Anregungswahrscheinlichkeit eines Fluorophors proportional zu  $\cos^2 \vartheta$  ist ( $\vartheta$  ist der Winkel zwischen der vertikalen Achse und dem Übergangsdipolmoment des Fluorophors), kann die maximale Fluoreszenzanisotropie nicht größer als 0.4 werden, wenn die Orientierung der Fluorophore in der Lösung zufällig verteilt ist. Diese winkelabhängige Anregungswahrscheinlichkeit ist als Photo Selektion bekannt. Zusätzlich kann die Anisotropie um einen Faktor von  $(3\cos^2 \beta - 1) / 2$  reduziert sein, wenn ein Winkel  $\beta$  zwischen den Übergangsdipolmomenten der Anregung und der Emission existiert.

Die Photophysik von Tryptophan ist komplex aufgrund von zwei überlappenden Übergängen in den  $^1L_a$ - und den  $^1L_b$ -Zustand bei 240-300 nm [37]. Da der  $^1L_a$ -Zustand in der Lösung wie auch im Protein eine kleinere Energie hat, ergibt sich die Tryptophan-Fluoreszenz eines Proteins immer aus dem  $^1L_a$ -Zustand unabhängig davon, welcher Zustand zuerst besetzt wurde. Wird Tryptophan mit einer Wellenlänge über 295 nm angeregt, kann nur der  $^1L_a$ -Zustand erreicht werden, wodurch die Absorption und Fluoreszenz demselben angeregten Zustand angehören. Verwendet man jedoch kürzere Wellenlängen für die Anregung, wird auch der  $^1L_b$ -Zustand besetzt werden. Da die Übergangsdipolmomente für die Absorption zum  $^1L_b$ -Zustand und der Emission aus dem  $^1L_a$ -Zustand senkrecht zueinander stehen, wird die maximale Anisotropie um den

Faktor  $(3\cos^2 90^\circ - 1) / 2 = -0.5$  stark reduziert, wenn der  $^1L_b$  beteiligt ist. Dieser Effekt ist bei einer Wellenlänge von 290 nm am stärksten ausgeprägt, was ein weiterer Grund dafür ist, eine Wellenlänge im Bereich von 295-300 nm zu wählen, um Proteinfluoreszenz zu messen [36].

Die zwei Rotationskorrelationszeiten beziehen sich im Allgemeinen auf die Gesamtrotation des Proteins ( $\theta_1$ ) und die Eigenrotation des Tryptophanrestes innerhalb des Proteinmoleküls ( $\theta_2$ ). Genauer gesagt findet die Bewegung des Fluorophors während der Bewegung des Proteins statt, und deshalb ist die lokale Rotationskorrelationszeit  $\theta_F$  für die Bewegung des Fluorophors unter Berücksichtigung der Proteinrotation nur dann gleich  $\theta_2$ , wenn dessen Bewegung deutlich schneller ist als die des Proteins. Es gilt dann  $1 / \theta_2 = 1 / \theta_1 + 1 / \theta_F \approx 1 / \theta_F$ . Es ist interessant anzumerken, dass der Faktor  $g_1$ , der mit der Gesamtrotation des Proteins verbunden ist, als Maß für die lokale Beweglichkeit des Tryptophanrestes innerhalb des Proteins herangezogen werden kann. Existiert keine lokale Bewegung, ist  $g_2 = 0$  und  $g_1 = 1$ , was maximale Ordnung bedeutet. Ist das Protein allerdings entfaltet, wird die Rotation des Tryptophanrestes im Idealfall uneingeschränkt sein, und  $g_1$  ist erwartungsgemäß gleich Null.  $g_1$  lässt sich aus dem allgemeinen Ordnungsparameter  $S$  für die lokale Bewegung von Tryptophan herleiten: Der Winkel  $\alpha$ , der Trp-Umorientierung, lässt sich aus folgender Gleichung erhalten [38]:

$$g_1 = S^2 = \left[ \frac{1}{2} \cos \alpha (1 + \cos \alpha) \right]^2 \quad (3.2-10)$$

Es ist zu beachten, dass die oben gemachten Annahmen für gelöste Proteine und Proteine die an kolloidalen oder planaren Oberflächen adsorbiert sind, nur dann gelten, wenn die Fluorophore zufällig orientiert sind. Eine bevorzugte Orientierung der Proteinmoleküle auf einer planaren Oberfläche würde einen Einfluss auf die maximale Anisotropie  $r_0$  haben.

### 3.3 Neutronen- und Röntgenreflektometrie

Die Neutronen- und Röntgenstreureflektometrie sind ähnlich in ihrem experimentellen Aufbau und ihrer theoretischen Beschreibung [39, 40]. Die spekulare Reflektivität der untersuchten Grenzfläche wird als Funktion des Eintrittswinkels gemessen. Daraus erhält man eine Reflektivitätskurve, die gewöhnlich ausgewertet wird, indem man eine berechnete Reflektivitätskurve anpasst.

Wie in der optischen Reflektometrie kann die Berechnung einer Neutronen- oder Röntgenreflektivitätskurve auf einem Schichtmodell, das mit Hilfe der Matrix-Methode [41, 42] beschrieben wird, basieren. Da Neutronen- und Röntgenreflektivitäten bei kleinen Eintrittswinkeln gemessen werden (relativ zur Grenzfläche), können Strukturdetails einer Schicht vernachlässigt werden, und die Schicht lässt sich einfach durch ihren Brechungsindex charakterisieren. Dieser lässt sich aus der Streulängendichte  $\rho$  bei der Verwendung von Neutronen oder der Elektronendichte  $\rho_e$ , wenn Elektronen genutzt werden, nach folgenden Gleichungen erhalten:

$$n = 1 - \frac{\lambda^2}{2\pi} \rho - i \frac{\lambda}{4\pi} \mu_{\text{Neutron}} \quad (3.3-1)$$

$$n = 1 - \frac{\lambda^2}{2\pi} \rho_e r_e - i \frac{\lambda}{4\pi} \mu_{\text{Röntgen}} \quad (3.2-2)$$

hierbei ist  $\lambda$  die Wellenlänge der Eintrittsstrahlung,  $r_e = 2.818 \times 10^{-15}$  m ist der klassische Elektronenradius,  $\mu_{\text{Neutron}}$  und  $\mu_{\text{Röntgen}}$  sind die linearen Absorptionskoeffizienten für Neutronen und Röntgenstrahlung.  $\mu_{\text{Neutron}}$  ist sehr klein und unbedeutend für die meisten Isotope. Im Folgenden wird nicht mehr zwischen Neutronen- und Röntgenstrahlung unterschieden, und es kann mit dem Snelliusschen Brechungsgesetz (Gl. 3.3-3) zur Berechnung der Reflexionswinkel (relativ zur Grenzfläche) fortgesetzt werden (Abb. 3.3-1).

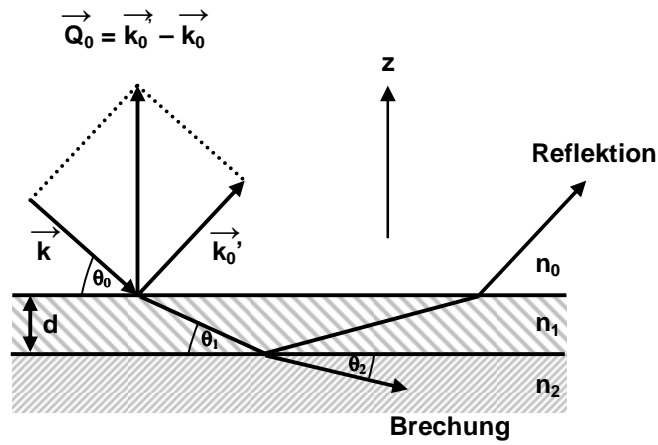


Abb. 3.3-1 Reflektion und Brechung an einer Multischicht, die durch die Brechungsindices  $n_0$ ,  $n_1$ ,  $n_2$  und die Schichtdicke  $d_1$  charakterisiert ist [13].

$$n_i \cos \theta_i = n_{i+1} \cos \theta_{i+1} \quad (3.3-3)$$

Mit diesen Winkeln ist die z-Komponente des Streuvektors senkrecht zur Grenzfläche (Abb. 3.3-1) gegeben als:

$$Q_i = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta_i \quad (3.3-4)$$

Die z-Komponenten der Streuvektoren von zwei aufeinander folgenden Schichten bestimmen den Reflektivitätskoeffizient der gesamten Grenzfläche:

$$r_{i,i+1} = \frac{Q_i - Q_{i+1}}{Q_i + Q_{i+1}} \exp\left(-\frac{1}{2} Q_i Q_{i+1} \sigma_{i,i+1}^2\right) \quad (3.3-5)$$

In dieser Gleichung ist ein exponentieller Term enthalten, der die Rauigkeit  $\sigma_{i,i+1}$  der Grenzfläche zwischen der Schicht  $i$  und  $i+1$  berücksichtigt. Damit lässt sich eine charakteristische Matrix für jede Schicht erstellen:



$$M_i = \begin{pmatrix} \exp(i\beta_{i-1}) & r_{i,i+1} \exp(i\beta_{i-1}) \\ r_{i,i+1} \exp(-i\beta_{i-1}) & \exp(-i\beta_{i-1}) \end{pmatrix} \quad (3.3-6)$$

mit  $\beta_i$  als Phasenverschiebung, die gegeben ist durch

$$\beta_i = \frac{1}{2} n_i Q_i d_i \quad (3.3-7)$$

Die Phasenverschiebung hängt von der Schichtdicke  $d_i$  ab. Die Reflektivität der Gesamtschicht wird dann durch Matrixmultiplikation der Einzelschichten erhalten:

$$M_1 M_2 M_3 \dots M_n = \begin{pmatrix} M_{11} & M_{12} \\ M_{21} & M_{22} \end{pmatrix} \quad (3.3-8)$$

und

$$R(Q) = \frac{|M_{12}|^2}{|M_{22}|^2} \quad (3.3-9)$$

während  $Q = Q_0$  sich auf den Eintrittswinkel in die erste Schicht bezieht (Abb.3.3-1). Demnach kann die Reflektivität  $R(Q)$  der Multischicht als Funktion der Streulängendichten (oder Elektronendichten)  $\rho_i$ , der Grenzflächenrauigkeiten  $\sigma_{i, i+1}$ , und der Schichtdicken  $d_i$ , berechnet werden. Durch Variation dieser Parameter wird  $R(Q)$  an die experimentell erhaltene Reflektivitätskurve angepasst. Es muss allerdings beachtet werden, dass das Streulängendichteprofil, das man auf diese Art und Weise erhält, nicht einzigartig sein kann. Um die Anzahl der Streulängendichteprofile, die konsistent mit den experimentellen Daten sind, zu minimieren, kann die Kontrastvariationstechnik angewandt werden. Im Fall der Neutronenreflektivität wird dazu gewöhnlich ein  $D_2O / H_2O$ -Austausch durch-

geführt. Es werden dann unterschiedliche Reflektivitätskurven gemessen, die mit demselben Strukturprofil übereinstimmen müssen.

### **3.4 Surface-Plasmon-Resonance (SPR)-Spektroskopie**

Die Anregung von Oberflächenplasmonen auf planaren Oberflächen durch Licht wird gemeinhin als Oberflächenplasmonenresonanz (*Surface-Plasmon-Resonance*, SPR) bezeichnet. Dieses Phänomen ist die Basis für zahlreiche biochemische Analysemethoden zur Messung der Adsorption von Materie auf planaren Metalloberflächen (typischerweise Gold und Silber). Beispiele gibt es aus dem Bereich der Gassensoren, Biosensoren und Immunosensoren. Im Wesentlichen werden drei verschiedene Arten für die Erzeugung von Oberflächenplasmonen unterschieden: Prismen, Gitter und Lichtwellenleiter mit interner Totalreflexion, die auf verschiedene Art und Weise angeordnet werden können [103-108].

Gewöhnliche SPR-Messungen wie sie bei Biosensoren zur Anwendung kommen, werden zur Bestimmung der Filmdicke ultradünner organischer Filme auf Metalloberflächen ausgenutzt [109]. Das SPR-Phänomen tritt auf, wenn ein Lichtstrahl von p-polarisiertem Licht mit einer bestimmten Wellenlänge durch ein Prisma schreitet und anschließend in einem bestimmten Winkel auf eine Metalloberfläche trifft. Unter diesen Voraussetzungen entstehen an der Metall / Dielektrikum-Grenzfläche elektromagnetische Photonen – Plasmonen - Oberflächenwellen (Oberflächenpolaritonen). Diese Wellen propagieren parallel zur Metall / Dielektrikum-Grenzfläche und das damit assoziierte optische elektrische Feld fällt exponentiell von der Metalloberfläche in das Dielektrikum hinein ab. Dabei werden typischerweise Eindringtiefen im Bereich von 200 nm erreicht [109]. Als Folge dieses Effektes erhält man eine reduzierte Intensität des reflektierten Strahles bei diesem Winkel. Die Reflektivität des Eingangslichtes bei einem gegebenen Winkel  $\theta$  lässt sich mit Hilfe einer Freseniusgleichung für ein Dreischichtsystem berechnen [110]. Das System besteht dabei aus drei Medien j:

einem Glasprisma, einem Metallfilm und der untersuchten Schicht, die mit den Indices  $\gamma$ ,  $\mu$  und  $\rho$  im Folgenden entsprechend vermerkt werden. Die Reflektivität  $R$  berechnet sich dann nach Gleichung 3.4-1 wie folgt:

$$R = \left| \frac{r_{\gamma\mu} + r_{\mu\rho} e^{2ik_{\mu}d}}{1 + r_{\gamma\mu} r_{\mu\rho} e^{2ik_{\mu}d}} \right| \quad (3.4-1)$$

mit  $k_j = \sqrt{\epsilon_j \frac{\omega^2}{c^2} - k_z^2}$  für  $j = \gamma, \mu, \rho$  und  $k_z = \sqrt{\epsilon_{\gamma}} \frac{\omega}{c} \sin\theta$  und der Amplitudenreflektanz  $r$  für die Prisma-Metall- und Metall-Lösung-Grenzfläche, die durch die folgenden Gleichungen gegeben ist:

$$r_{\gamma\mu} = \frac{k_{\gamma}\epsilon_{\mu} + k_{\mu}\epsilon_{\gamma}}{k_{\gamma}\epsilon_{\mu} - k_{\mu}\epsilon_{\gamma}} \quad (3.4-2)$$

$$r_{\rho\mu} = \frac{k_{\mu}\epsilon_{\rho} + k_{\rho}\epsilon_{\mu}}{k_{\mu}\epsilon_{\rho} - k_{\rho}\epsilon_{\mu}} \quad (3.4-3)$$

dabei ist  $\epsilon_j$  und  $k_j$  die dielektrische Konstante und die senkrechte Komponente des Wellenvektors im entsprechenden Medium  $j$  (Prisma, Metall oder untersuchte Schicht),  $k_z$  die Wellenvektorkomponente der einfallenden Strahlung parallel zur Grenzfläche,  $\omega$  die Winkelfrequenz der einfallenden Strahlung ( $\omega(\lambda) = 2\pi c/\lambda$ ),  $d$  die Dicke des Metallfilms und  $c$  die Lichtgeschwindigkeit.

Nach Gleichung 3.4-1 bis 3.4-3 ändert sich die Reflektanz mit der Dielektrizitätskonstante der untersuchten Schicht [110], die dem Quadrat des Brechungsindex entspricht und aus  $N$  Absorptionsoszillatoren pro Volumeneinheit besteht. Die Anzahl  $N$  ist dabei abhängig von der Ligandenkonzentration auf der Schichtoberfläche.

Bei konventionellen Biosensoren, wie sie in den Biacoreinstrumenten vorliegen, wird monochromatisches Licht mit einer breiten Verteilung der Eintrittswinkel

verwendet und das reflektierte Licht in Abhängigkeit des Austrittswinkels an unterschiedlichen Punkten am Detektor gemessen [111, 112]. Der Detektor misst kontinuierlich die Position mit reduzierter Lichtintensität und berechnet daraus den SPR-Winkel des reflektierten Lichtes, wodurch die Empfindlichkeit des Detektionssystems erhöht wird. Nach Gleichung 3.4-4 [113-116] ist die Änderung im SPR-Winkel  $\theta$  des reflektierten Lichtes bei einer gegebenen Wellenlänge mit den Konstanten  $c_1$  und  $c_2$  direkt von der Änderung im Brechungsindex  $n$  an der Oberfläche und von der Änderung in der Dicke  $d$  der Schicht abhängig.

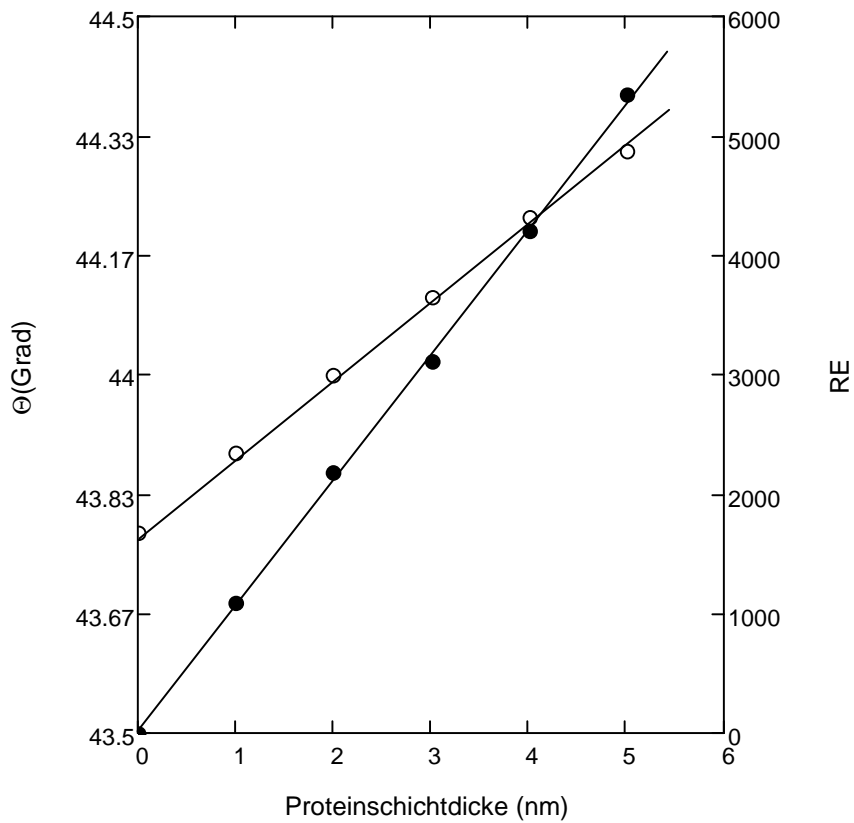
$$\Delta\theta(\lambda) = c_1\Delta n + c_2\Delta d \quad (3.4-4)$$

Zudem führt jede Änderung in der Adsorbatdicke ( $\Delta d$ ) die beispielsweise durch eine Konformationsänderungen des Proteins, Aufquellen des Adsorbates oder ein Bindungsereignis zustande kommen kann, nach der Lorentz-Lorenz Gleichung (3.4-5) [113] zu einer Änderung im Brechungsindex ( $\Delta n$ ):

$$\Delta n = -\frac{1}{6n} (n_p^2 + 2)^2 \left( \frac{n_p^2 - 1}{n_p^2 + 2} - \frac{n_w^2 - 1}{n_w^2 + 2} \frac{V_p}{V} \right) \frac{\Delta d}{d} \quad (3.4-5)$$

dabei ist  $n_p$  der Brechungsindex des Proteins,  $n_w$  der Brechungsindex von Wasser,  $V_p$  das Volumen des Proteins und  $V$  das Volumen der Proteinschicht ( $V = V_p + V_w$ ). Die Änderung im SPR-Winkel wird als Resonanzeinheit (RE) dargestellt. Eine Änderung von 103 RE entspricht einer Winkeländerung von  $0.1^\circ$ , was die meisten Proteine durch Bindung an die Grenzfläche von ungefähr  $1 \text{ ng mm}^{-2}$  verursachen [112]. Die theoretische Winkeländerung lässt sich mit komplexen Freseniusgleichungen berechnen [109]. Der Graph in Abbildung 3.4-2 zeigt die Änderung im reflektierten SPR-Winkel  $\theta$  und der entsprechenden Änderung in den Resonanzeinheiten (RE) die bei einer Dicke der Proteinschicht im Bereich von 0-5 nm auf einer 50 nm dicken Goldschicht erreicht wird. Wie sich feststellen lässt verhalten sich die Abhängigkeiten linear [117]. Demnach ist das Instrument in der Lage in Echtzeit die Veränderung der Adsorbatdicke und des

Brechungsindex darzustellen; Veränderungen die eine Konsequenz der biomolekularen Wechselwirkung sind die an der Goldoberfläche stattfindet.



*Abb. 3.4-2* Entwicklung des SPR-Winkels des reflektierten Lichtes (offene Kreise) und die entsprechenden Resonanzeinheiten (RE, geschlossene Kreise) in einem konventionellen Biosensorinstrument als Funktion der Dicke einer Proteinschicht an einer Goldoberfläche [108].

## **4 Experimenteller Teil**

### **4.1 Herstellung der Proteinlösungen**

Lysozym aus Hühnereiweiß wurde von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) bezogen. Rinderserumalbumin,  $\alpha$ -Lactalbumin (Katalog Nr. L6010) und Rinderinsulin (Katalog Nr. I5500) wurde von Sigma (Taufkirchen, Germany) erworben. Die Proteine sind ohne weitere Aufarbeitung in wässrigen Pufferlösungen gelöst worden. Die Pufferlösungen wurden mit 10 mM Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) oder Morpholinoethansulfonsäure (MES) hergestellt und mit konzentrierter NaOH auf den gewünschten pH-Wert gebracht. Für die Neutronenstreuexperimente wurden die Pufferlösungen mit D<sub>2</sub>O präpariert und auf den gewünschten pD-Wert mit Hilfe eines konventionellen pH-Meters gebracht. Es wurde dabei 0.4 zum Messwert addiert ( $pD = \text{Messwert} + 0.4$ ) [43]. Zur Markierung der Proteine wurde Alexa-Fluorophor-488-Farbstoff der Firma Invitrogen verwendet (Karlsruhe, Deutschland) und dabei den Anweisungen des Herstellers gefolgt. Dieser Farbstoff hat den Vorteil, unempfindlich auf pH-Wert-Änderungen im Bereich von 4-10 zu sein. Der Alexa Fluorophor 488 reagiert mit den primären Aminogruppen des Proteins (hauptsächlich den Lysinseitenketten). Der Markierungsgrad (Anzahl der Farbstoffmoleküle pro Proteinmolekül) wurde mit Hilfe der UV-Spektroskopie im Bereich von eins gefunden.

### **4.2 PAS-Bürsten Präparation**

Die Präparation der planaren Polyacrylsäure-Bürsten wurde nach Literaturangaben [44] jedoch mit geringfügigen Modifikationen vorgenommen. Für die TIRF-Messungen wurde eine Suprasil-Quarzscheibe der Firma Hellma (Mühlheim, Deutschland) mit einer Abmessung von 47 x 15 x 1 mm<sup>3</sup> verwendet. Die Quarzoberfläche wurde mit einem Gemisch von konz. NH<sub>3</sub>, konz. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und dest. H<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:1:4 gereinigt und anschließend mit bidestilliertem

Wasser intensiv abgespült (modifizierte RCA Reinigungsmethode) [45]. Auf einer polierten Oberfläche wurde dann mit Hilfe eines *Spin – Coaters* (Modell KW-4A, Firma Chemat Technology, Fujian, England), ein dünner Film bestehend aus Polystyrol (PS) (Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), mit einem Molekulargewicht von  $44\,000\text{ g mol}^{-1}$ , aufgebracht. Dabei wurde eine PS-Konzentration von  $6\text{ mg mL}^{-1}$  und eine Rotationsgeschwindigkeit von  $3000\text{ U / min}$  verwendet. Auf diese Art wird ein PS – Film mit einer Dicke im Bereich von  $250\text{--}300\text{ Å}$  erhalten [46]. Danach wurden zwei Quarzscheiben mit PS-Film mit ihren unmodifizierten Rückseiten aneinandergelagt und in die Subphase eines Langmuir-Trogs (Modell 611D, Firma Nima, England) getaucht. Dann wurden  $5\text{ mg}$  des Diblock-Copolymers Polystyrol-Polyacrylsäure (PSPAS, durchschnittlich  $32$  Styrol- und  $278$  Acrylsäureeinheiten) (Firma Polymersource, Montreal, Kanada) in einem Lösemittelgemisch aus  $3\text{ mL}$  1,4 Dioxan und  $2\text{ mL}$  Toluol gelöst. Anschließend wurde mit einer Hamiltonspritze tropfenweise gerade soviel Copolymerlösung auf der Oberfläche der Wassersubphase verteilt, dass eine Packungsdichte der PSPAS-Monoschicht von  $0.1$  Ketten pro  $\text{nm}^2$  vorliegt. Der pH-Wert der Subphase wurde auf  $4$  eingestellt, um die Anzahl der Ladungen der PAS-Ketten zu verringern und dadurch die Copolymer-Monoschicht zu stabilisieren. Danach wurden die Quarzscheiben langsam aus der Subphase durch die Monoschicht des Copolymers gezogen, wodurch der Copolymerfilm auf die Scheiben übertragen wurde. Gleichzeitig schloss sich die Barriere des Langmuir-Trogs, um die Oberflächenkonzentration der Monoschicht konstant zu halten. Aus der Änderung der Größe der Monoschichtoberfläche wurde ein Übertragungsverhältnis von etwa  $1.1$  ermittelt, was einer erhaltenen Bürstendichte von  $0.11\text{ nm}^{-2}$  entspricht. Zum Abschluss wurden die Plättchen für  $10$  Minuten auf  $110^\circ\text{C}$  erwärmt, was zur Diffusion der PS-Ketten des Copolymers in den PS-Film führt und dabei eine stabile, irreversibel verankerte PAS-Bürste hinterlässt.

Zur Präparation der PAS-Bürsten, wie sie für die SPR-Experimente verwendet wurden, sind anstelle der Quarzscheiben Goldsensorchips der Firma Biacore

(GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) aus dem SIA-Goldset verwendet worden. Außerdem war zu Erstellung des PS-Filmes eine höhere Umdrehungszahl von  $6000 \text{ U min}^{-1}$  notwendig, um einen optisch homogenen Film zu erhalten. Bei der Präparation der PAS-Bürsten für die Neutronenstreuexperimente wurden an der bereits erwähnten Vorgehensweise folgende Änderungen durchgeführt. Statt einer Quarzscheibe wurde ein Siliziumblock mit den Maßen  $80 \times 50 \times 15 \text{ mm}^3$  als Substrat verwendet und eine der beiden großen Flächen poliert. Anstelle von PS wurde perdeutrieretes Polystyrol (dPS) von Polymer Standards Service (Mainz, Deutschland) auf die polierte Seite des Siliziumblocks durch spin-coating bei  $4000 \text{ U / min}$  aufgebracht. Die dPS-Konzentration betrug dabei  $6 \text{ mg mL}^{-1}$  in Toluol. Das PSPAS-Copolymer wurde durch ein deutrieretes Diblock-Copolymer Poly- $\text{D}_8$ -styrolpolyacrylsäure (dPSPAS) von Polymer-Source (Montreal, Kanada) ersetzt. Das Copolymer bestand aus 49  $\text{D}_8$ -Styrol- und 222 Acrylsäuremonomeren (Durchschnittswerte). Das Copolymer dPSPAS wurde anschließend auf die dPS-beschichtete Seite des Siliziumblocks durch Anwendung der Langmuir-Schäfer-Technik aufgebracht. Es wurde dazu die dPS-beschichtete Seite des Siliziumblocks um wenige Grad zur Oberfläche des Monofilms geneigt. Dadurch ist die Kontaktlinie mit der Copolymermonoschicht, langsam über den dPS-Film gewandert, während der Si-Block auf die Subphase gesetzt und anschließend wieder von der Oberfläche herausgehoben wurde. Dies führte zu einer sehr homogenen Übertragung der Copolymermonoschicht auf den dPS-Film des Si-Blocks. Wie aus Röntgenreflektivitätsmessungen (Kap. 5.1, Seite 47) ermittelt wurde, ist hierbei eine Bürstendichte von  $0.1 \text{ nm}^{-2}$  erhalten worden. Anzumerken wäre, dass alle präparierten Polyacrylsäure-Bürsten stabil waren und in keinem der durchgeführten Experimente ein Ablösen von der Oberfläche zu beobachten war.



### 4.3 Präparation der PAH / PSS-Multischichten

Die Präparation der Polyelektrolytmultischichten erfolgte auf denselben Si-Wafern wie sie auch bei der Präparation der PAS-Bürsten unter Punkt 4.2 verwendet wurden. Die Reinigung erfolgte ebenfalls wie unter Punkt 4.2 beschrieben. Die Polyelektrolyte Polyethylenimin (PEI,  $M_W = 750\,000\text{ g mol}^{-1}$ , Abb. 4.3-1), Polystyrolsulfonat (PSS,  $M_W = 70\,000\text{ g mol}^{-1}$ , Abb.4.3-1), und Polyallylaminhydrochlorid (PAH,  $M_W = 70\,000\text{ g mol}^{-1}$ , Abb.4.3-1) wurden von Sigma bezogen. Nach den folgenden Schritten wurde eine Polyelektrolytmultischicht auf den Si-Wafer aufgebracht [47]: Beginnend mit dem Eintauchen des Wafers in eine wässrige PEI-Lösung (0.01 M Monomere) für 20 Minuten wurde der Wafer anschließend abwechselnd in eine PSS- und PAH-Lösungen (0.01 M Monomere, 1 M Natriumchlorid) für jeweils 20 Minuten eingetaucht. Nach jeder aufgetragenen Schicht wurde intensiv mit dest. Wasser gespült.

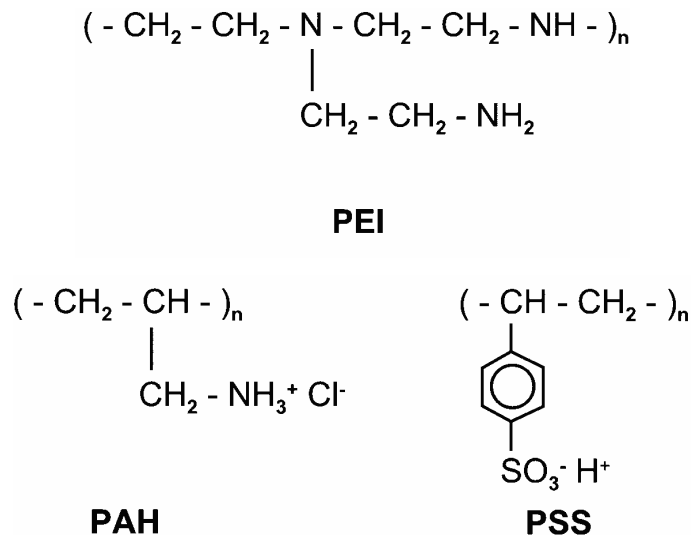


Abb. 4.3-1 Strukturformeln der zum Aufbau einer Polyelektrolytmultischicht verwendeten Polymere

#### **4.4 Durchführung der Röntgenreflektometriemessungen**

Die Präparation der PAS-Bürsten wurde durch Röntgenreflektivitätsmessungen mit einem Röntgenstrahlreflektometer der Firma GE Inspection Technologies (Ahrensburg, Deutschland, Modell XRD 3000 TT) überprüft. Eine Wellenlänge von 1.54 Å, die mit einer Kupferanode generiert wurde, ist dabei verwendet worden. Die Rohdaten wurden zu Reflektivitätskurven konvertiert, indem die reflektierte Intensität auf die eingestrahlte Strahlintensität normiert wurde. Zusätzlich wurden die Daten in Bezug auf die Größe der beleuchteten Fläche (footprint) korrigiert, die bei kleinen Winkeln größer werden kann als die Probenoberfläche (die Eintrittswinkel wurden relativ zur Grenzfläche gemessen). Reflektivitätskurven wurden als Funktion des Streuvektorübertrags  $Q$  dargestellt, mit  $Q = (4\pi/\lambda) \sin\theta$  ( $\lambda$  ist die Wellenlänge und  $\theta$  der Eintrittswinkel der Röntgenstrahlung).

#### **4.5 Durchführung der Neutronenstreuexperimente**

Die Neutronenstreuexperimente, die unter den Punkten 5.3.1 und 5.3.3 diskutiert werden, wurden am Hahn-Meitner-Institut in Berlin (Deutschland) am Instrument V6 [48] durchgeführt. Die Wellenlänge der Neutronen, die mit Hilfe eines Graphit-Monochromators gewählt wurde, betrug 4.66 Å; höhere Ordnungen der Wellenlänge wurden mit Hilfe eines Be-Filters, der mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, unterdrückt. Die Probenzelle bestand aus einem Si-Wafer, der mit einer Polyacrylsäure-Bürste auf der Unterseite (8 cm x 5 cm) beschichtet war, und einem Teflontrog, der darunter befestigt wurde und mit der Probenlösung befüllt worden ist. Die Probenzelle wurde mit einem Wassermantel temperiert. Die Neutronen sind durch eine der schmalen Seiten des Wafers eingetreten und wurden dann teilweise an der Si / PS / PAS / Lösung - Grenzfläche reflektiert. Anschließend verließ der Neutronenstrahl die Probenzelle wieder durch die andere schmale Seite des Si-Wafers. Die Reflektivität der Neutronen wurde mit einem festen Eintrittswinkel des Neutronenstrahls, in  $\theta / 2\theta$ -Geometrie, mit einem

$^3\text{He}$ -Detektor gemessen. Die erhaltenen Rohdaten wurden auf die Anzahl der eingestrahlten Neutronen normiert und als Funktion des Streuvektorübertrags  $Q$  dargestellt. Vor jeder Messung wurde die Zelle gespült, mit frisch präparierter Probenlösung befüllt und für mindestens 1 Stunde äquilibriert. Die Neutronenreflektivitätskurven wurden durch Anpassen von berechneten Kurven ausgewertet, die mit Hilfe des Programms Parratt32 berechnet wurden (Version 1.6, Hahn-Meitner-Institut Berlin, Deutschland).

Die Neutronenstreuexperimente die unter Punkt 5.3.2 erläutert werden, sind am *time-of-flight*-Neutronenreflektometer AMOR, am Paul-Scherer-Institut in Villingen (Schweiz), durchgeführt worden [49]. Dort wurde ein kalter Neutronenstrahl durch einen Strahlzerhacker (*Chopper*)-System geleitet, das den Fluganfang und die Bandbreite der Neutronenpulse definierte. Die Neutronenpulse wurden unter Eintrittswinkeln von  $0.3^\circ$ ,  $1.0^\circ$ , und  $1.6^\circ$  auf die modifizierte Silizium-Lösung-Grenzfläche geleitet, und anschließend wurden die reflektierten Neutronen als Funktion der Zeit in einem Abstand von 7.2 m zum Strahlzerhackersystem detektiert. Die drei Eintrittswinkel entsprechen  $Q$ -Intervallen von etwa  $0.009\text{--}0.027 \text{ \AA}^{-1}$ ,  $0.024\text{--}0.051 \text{ \AA}^{-1}$  und  $0.048\text{--}0.137 \text{ \AA}^{-1}$ . Die detektierten Neutronenreflektivitäten wurden anschließend auf die Intensität des Direktstrahls normiert und als Funktion des Streuvektorübertrags  $Q$  aufgetragen. Die Probenzelle bestand aus einem Si-Wafer, der mit einer Polyacrylsäurebürste auf der Unterseite (8 cm x 5 cm) beschichtet war, und einem Teflontrog, der unterhalb davon befestigt wurde und mit der Probenlösung befüllt worden ist. Die Probenzelle wurde mit einem Wassermantel temperiert. Die Neutronen sind wieder durch eine der schmalen Seiten des Wafers eingetreten und wurden dann teilweise an der Si / PS / PAS / Lösung-Grenzfläche reflektiert. Anschließend verließ der Neutronenstrahl die Probenzelle wieder durch die andere schmale Seite des Si-Wafers. Vor jeder Messung wurde die Zelle gespült, mit frisch präparierter Probenlösung befüllt und für mindestens 1 Stunde äquilibriert. Die Neutronenreflektivitätskurven wurden durch Anpassen von berechneten Kurven an die gemessenen ausgewertet. Die Berechnungen basierten auf Schicht-

modellen der Grenzflächenstruktur [39] und wurden mit Hilfe des Programms Parratt32 erstellt (Version 1.6, Hahn-Meitner-Institut Berlin, Deutschland).

#### 4.6 Durchführung der TIRF-Experimente

Für die *total internal reflection fluorescence* (TIRF)-Spektroskopie wurde ein K2-Instrument der Firma ISS (Champaign, Illinois, USA) und eine selbst angefertigte TIRF-Probenzelle verwendet (Abb. 3.2-5, Seite 24). Zur Anregung der mit Alexa 488-markierten Proteine wurde eine Xenon-Lichtbogenlampe eingesetzt und am Monochromator für die Anregung eine Wellenlänge von  $\lambda = 485$  nm eingestellt. Die Fluoreszenzintensität wurde im Photonenzählmodus durch einen *long pass*-Filter (50% Transmission bei 514 nm) gemessen. Für Messungen der Anisotropie muss das Fluoreszenzlicht senkrecht und Horizontal zum Anregungslicht gemessen werden [36]. Es wurde dazu der Versuchsaufbau wie er in Abbildung 4.6-1 zu sehen ist, gewählt. Die statische Fluoreszenzanisotropie wurde nach  $r = (I_{VV} - I_{VH}) / (I_{VV} + 2I_{VH})$  bestimmt, wobei sich  $I_{VV}$  und  $I_{VH}$  auf die Fluoreszenzintensitäten beziehen.  $I_{VV}$  wurde mit vertikal polarisiertem Licht gemessen, und  $I_{VH}$  ist gemessen worden, nachdem der Polarisator für die Emission in horizontale Richtung gedreht wurde. Fluoreszenzlebenszeiten wurden mit demselben Instrument in der Frequenzdomäne, mit Hilfe der Kreuz-Korrelations-Technik [50, 51], gemessen. Bei dieser Technik werden die Fluorophore mit intensitätsmoduliertem Licht angeregt, wodurch intensitätsmoduliertes Fluoreszenzlicht erhalten wird. Abhängig von der Fluoreszenzlebenszeit der Fluorophore und der Modulation der Anregungsfrequenz ist die Fluoreszenzemission relativ zur Anregung phasenverschoben und demoduliert. Die Phasenverschiebung und die Demodulation werden detektiert und nachfolgend als „Phase“ und „Modulation“ bezeichnet. Die Intensitätsmodulation im Anregungslicht fand mit Frequenzen im Bereich von 2 – 200 MHz statt. Bei den TIRF-Messungen wurde Streulicht als Referenz (mit  $\tau_{\text{Streulicht}} = 0$  ns) verwendet, während bei

den Messungen in Lösung die Fluoreszenzlebensdauer von Rhodamin 6G (mit  $\tau_{\text{Rhodamin 6G}} = 3.89 \text{ ns}$ ) als Referenz herangezogen wurde.

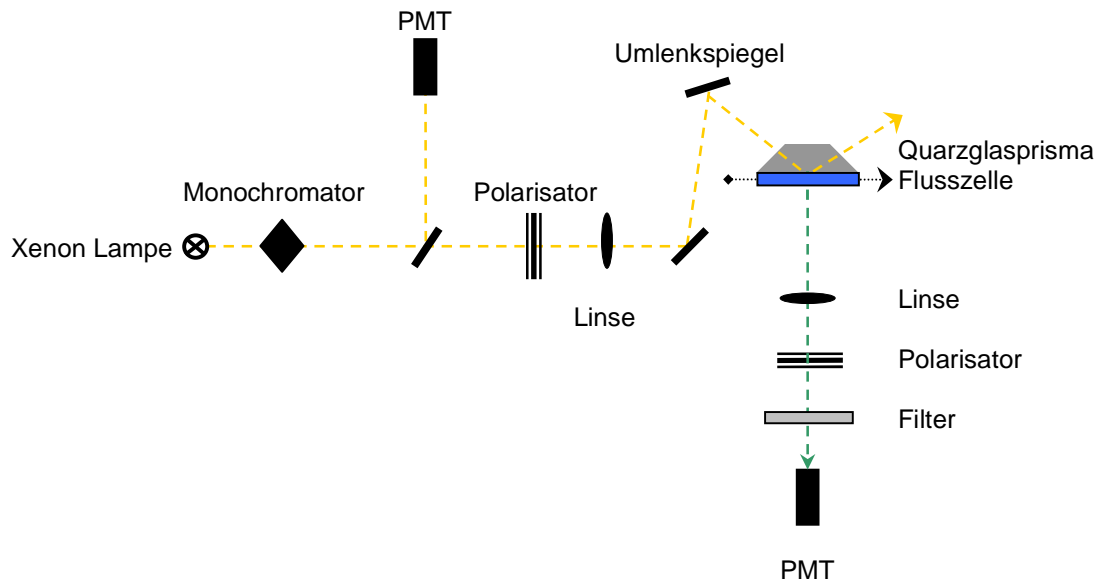


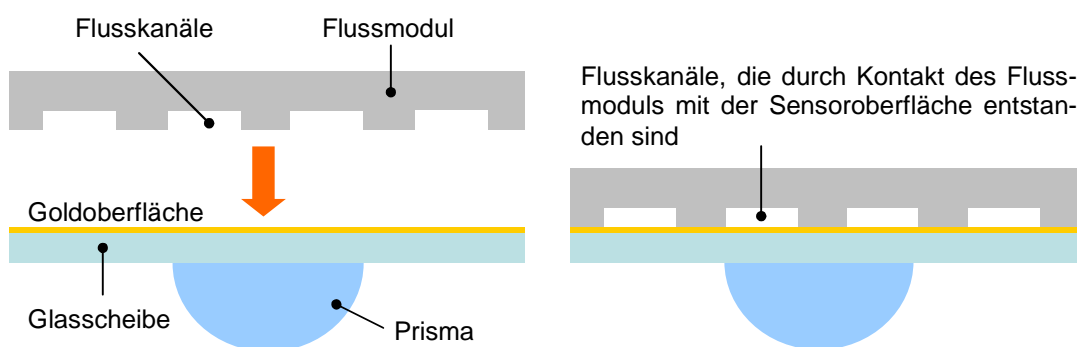
Abb. 4.6-1 Aufbau des TIRF-Spektrometers zur Bestimmung der zeitaufgelösten Anisotropie von Proteinen an einer PAS-Bürste

Die Probenzelle (Abb. 3.2-5, Seite 24) hat ein *Sandwich*-artiges Design, das aus einem Suprasil-Quarzprisma, einer Quarzscheibe mit einer Polyacrylsäurebürste, einer Silikongummidichtung, die die Probenlösung einschließt, und einer zweiten Quarzscheibe besteht. Das Quarzprisma wurde von der Firma Hellma (Müllheim, Deutschland) bezogen. Es hat eine Abmessung von  $47 \times 15 \times 15 \text{ mm}^3$  und Winkel von  $70^\circ$  zwischen der größten Seite ( $47 \times 15 \text{ mm}^2$ ) und den zwei schmalsten Seiten. Die Quarzscheibe mit der Polyacrylsäure-Bürste wurde mit einem Tropfen Glycerol optisch an das Quarzprisma gekoppelt. Die Silikongummidichtung hatte eine Dicke von 4 mm und wurde auf beiden Seiten mit den beiden Quarzscheiben versiegelt. Der Innenbereich der Dichtung wurde mit reiner Pufferlösung beziehungsweise Proteinlösung befüllt, indem zwei Spritzenadeln durch die Dichtung auf entgegengesetzten Seiten gestochen wurden. Die TIRF-Probenzelle wurde

anschließend in das K2-Instrument eingesetzt. Das Anregungslicht wurde mit Hilfe von zwei Umlenkspiegeln senkrecht auf eine der beiden schmalen Seiten des Prismas gelenkt (Abb. 4.4-1). Durch interne Reflexion des Lichtstrahls an der Quarz / PAS / Lösung – Grenzfläche wurden die Fluorophore von adsorbierten Proteinen zur Fluoreszenz angeregt. Die Proben wurden für etwa 15 Minuten vor der Messung äquilibriert. Die Daten wurden anschließend mit Globals WE Software (Laboratory for Fluorescence Dynamics, Universität von Kalifornien, Irvine, USA) ausgewertet.

#### 4.7 Durchführung der SPR-Experimente

Die SPR-Experimente wurden mit einem Biacore 3000 Instrument (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) ausgeführt. Durch automatisches Anpressen eines Mikroflussmoduls (IFC) an die präparierte Goldoberfläche entstehen vier Flusskanäle, die unabhängig voneinander angesteuert werden können (Abbildung 4.4-1). Die Flussrate in den Probenzellen betrug in allen aufgeführten Experimenten  $20 \text{ mL min}^{-1}$ . Die Temperatur wurde konstant bei  $25^\circ\text{C}$  gehalten und die Daten wurden mit einer Messfrequenz von 10 Hz aufgenommen.



*Abb. 4.4-1* Probenzellen des Biacore 3000 Instruments. Durch Anpressen eines Mikroflussmoduls gegen die Sensorchipoberfläche entstehen vier Flusskanäle [118].

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Röntgenreflektivitätsmessungen zur Charakterisierung einer Polyacrylsäure-Bürste

Die erfolgreiche Präparation der planaren PAS-Bürsten wurde durch Röntgenreflektivitätsmessungen an Luft überprüft. Eine Reflektivitätskurve (Abb. 5.1-1) ist anschließend mit der berechneten Kurve eines Schichtmodells angepasst worden [52].

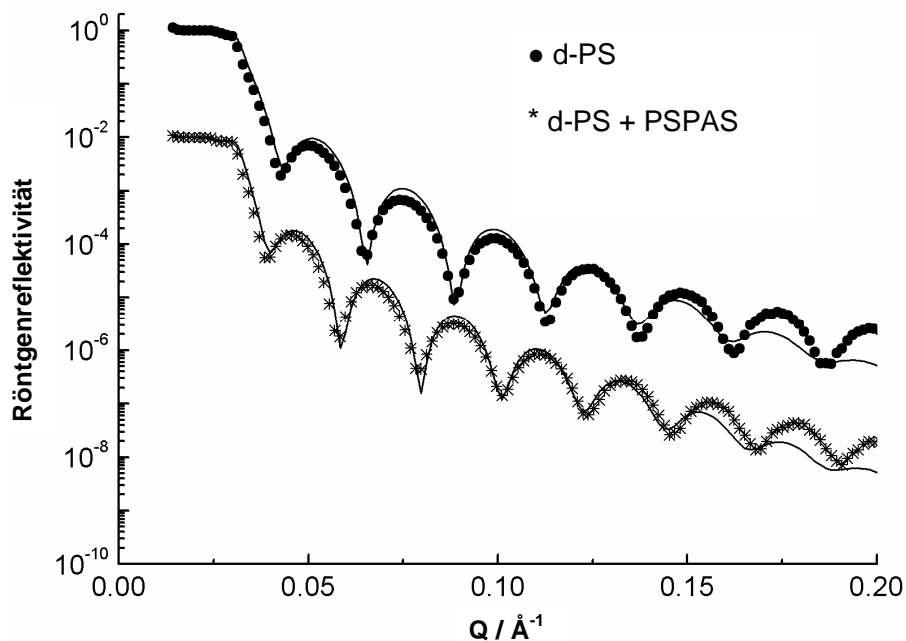


Abb. 5.1-1 Röntgenreflektivität eines Si-Blocks an der Luft. Die Daten zeigen die Reflektivitäten nach dem Auftragen des d-PS-Films mit perdeutertem Polystyrol (d-PS, gefüllte Kreise) und nachdem das Copolymer Polystyrol-polyacrylsäure auf den d-PS-Film aufgebracht wurde (d-PS + PSPAS, Sterne, verschoben um den Faktor  $10^{-2}$ ).  $Q$  ist der Wellenvektortransfer. Die festen Linien zeigen die Fits eines Ein- beziehungsweise Zweischichtenmodells. Vergleichbare Daten wurden erhalten wenn Quarzscheiben verwendet wurden.

Wurde beispielsweise eine PAS-Bürste auf einer Quarzscheibe präpariert, wurde für die Elektronendichte des PS-Films ein Wert von  $3.16 \times 10^{29}$  und für die PSPAS-Schicht ein Wert von etwa  $3.5 \times 10^{29} \text{ m}^{-3}$  gefunden. Die Diffusion der PS-Ketten in den PS-Film wurde im Schichtmodell vernachlässigt. Schichtdicken von 265 Å für den PS-Film und 36 Å für die trockene PSPAS-Bürsten wurden aus den Fits ermittelt. Die Parameter, die die PSPAS-Schicht charakterisieren, lassen eine kollabierte PAS-Bürste erkennen. Aus diesen Parametern lässt sich eine Bürstendichte von  $0.11 \text{ nm}^{-2}$  berechnen, was in sehr guter Übereinstimmung mit dem Erwartungswert von  $0.10 \text{ nm}^{-2}$  ist.

## **5.2 SPR-Experimente zur Kinetik der Adsorption von BSA und Lysozym an einer PAS-Bürste [100]**

Das SPR – Signal ist abhängig vom Brechungsindex an der Goldoberfläche des Sensorchips. Es ist deshalb eine Signaländerung zu erwarten, wenn Proteine an einer Polyacrylsäurebürste, mit der Goldoberfläche modifiziert wurde, adsorbieren oder wenn Salz zur Probenlösung hinzugegeben wird. Da Proben mit unterschiedlichen Ionenstärken verwendet wurden, ist zuerst der Einfluss der Ionenstärke auf das SPR-Signal quantifiziert worden. In Abb. 5.2-1 sind SPR-Daten aufgezeigt, die während des Spülens der Polyacrylsäure-Bürste mit NaCl-Pufferlösungen im Bereich von 25-300 mM gemessen wurden.



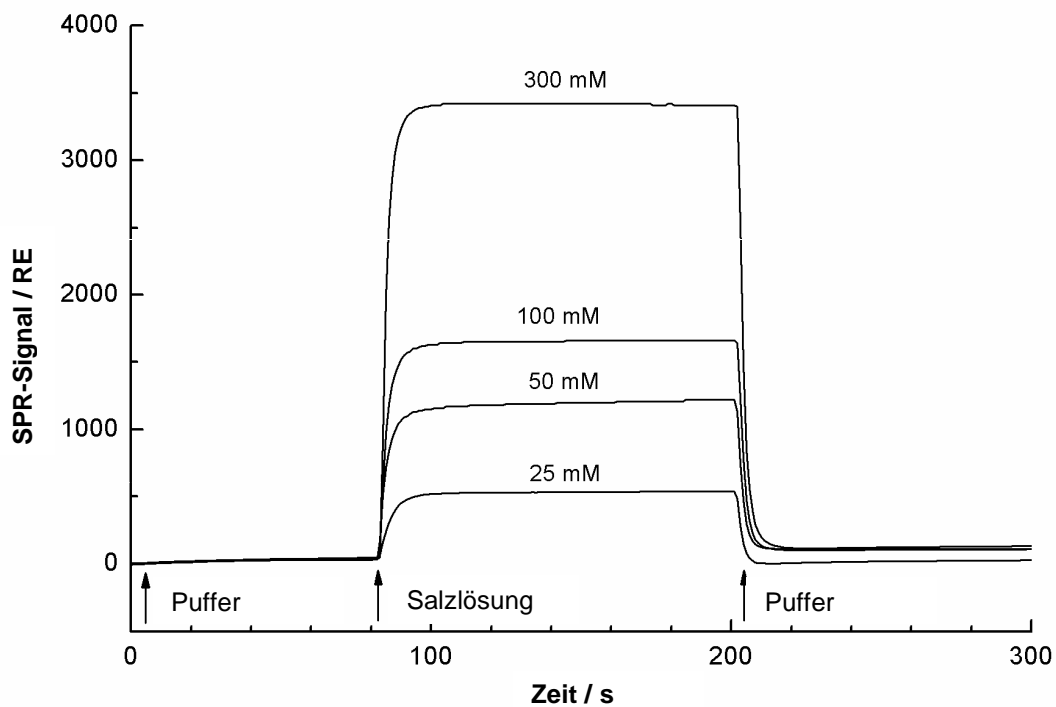


Abb.5.2-1 SPR-Antwort als Funktion der Zeit beim Spülen einer PAS-Bürste mit NaCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentration (RE: Resonanzeinheit).

Wie man aus Abb. 5.2-1 erkennen kann, ist die Änderung im SPR-Signal nicht proportional zur Ionenkonzentration, sondern nimmt mit zunehmender Salzkonzentration ab. Es ist bereits bekannt, dass sich die Bürstenstruktur mit der Salzkonzentration von einer gestreckten Konformation der PAS-Ketten, bei niedrigen Ionenkonzentrationen zu einer Knäulkonformation bei hohen Ionenkonzentrationen hinbewegt [53], was zu einer Veränderung im Brechungsindex führt und damit das nichtlineare Verhalten erklären könnte.

Abbildung 5.2-2 zeigt typische SPR-Messkurven, wie sie in Gegenwart von Lysozym erhalten wurden.

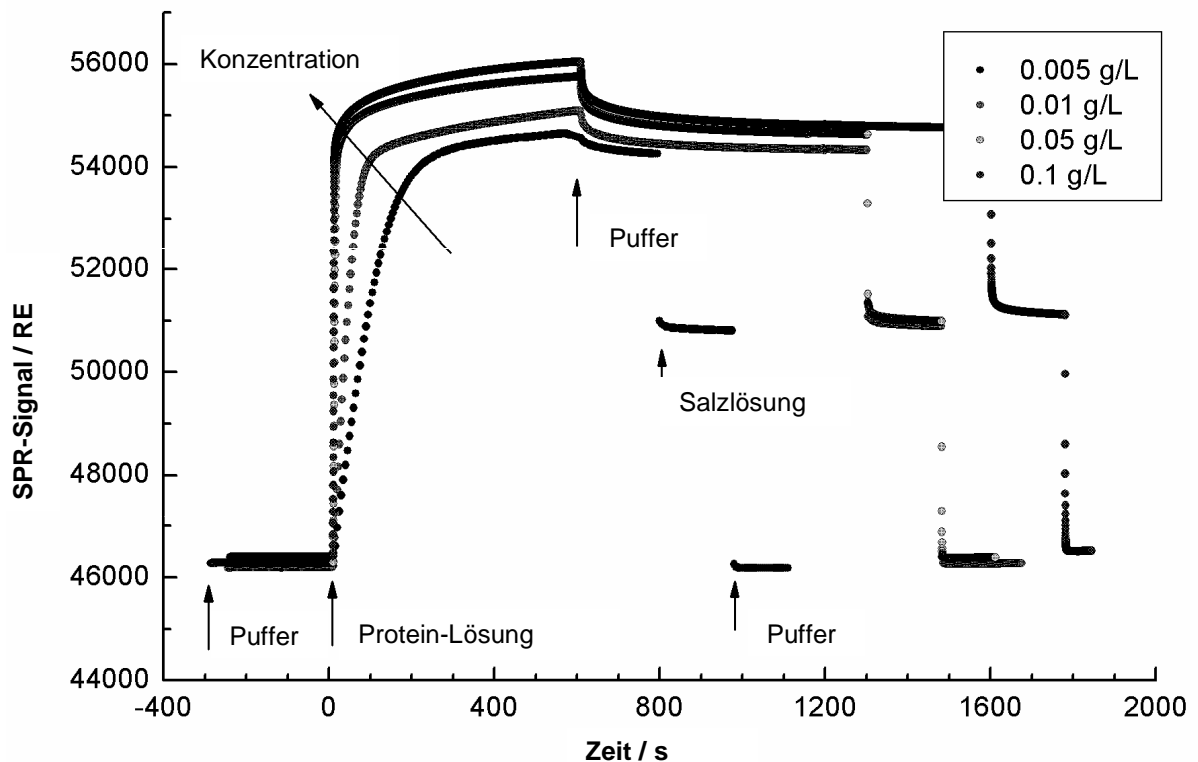


Abb. 5.2-2 SPR-Daten zur Adsorption von Lysozym an einer Polyacrylsäure-Bürste. Die Pufferlösung wurde auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Die Proteinlösungen hatten Konzentrationen, wie sie in der Legende aufgeführt sind. Proteindesorption konnte durch Spülen mit reiner Pufferlösung und einer NaCl-Pufferlösung der Konzentration 500 mM erreicht werden.

Der Verlauf lässt sich folgendermaßen erklären: Zu Beginn wurde mit Pufferlösung gespült und dann eine Proteinlösung der Konzentration  $0.005\text{--}0.1\text{ mg mL}^{-1}$  in Kontakt mit der Polyacrylsäurebürste gebracht. Als Antwort ist das SPR-Signal steil angestiegen, um sich anschließend schnell auf einen konstanten Wert einzustellen. Für eine typische Proteinkonzentration von  $0.1\text{ mg mL}^{-1}$  sind 90% des Plateau-Werts innerhalb von 5 Sekunden erreicht. Nach 10 Minuten ist das SPR-Signal bei allen Konzentrationen um etwa 9000 Einheiten angestiegen, was etwa  $9\text{ mg m}^{-2}$  adsorbiertem Lysozym auf der Polyacrylsäure-Bürste entspricht (hierbei wurde die Näherung  $1000\text{ Resonanzeinheiten} = 1\text{ mg m}^{-2}$  [54] verwendet).

Das Spülen mit reiner Pufferlösung hatte nur einen geringen Effekt auf das Adsorbat (Abb. 5.2-2). Nur etwa 10% des adsorbierten Lysozyms konnte durch Erniedrigung der Konzentration entfernt werden, was zeigt, dass ein Anteil von 10% der adsorbierten Proteinmoleküle reversibel gebunden ist. In Gegenwart einer NaCl-Konzentration von 500 mM findet jedoch nahezu vollständige Desorption statt. Wird mit 500 mM NaCl-Lösung gespült, pegelt sich das SPR-Signal aufgrund des erhöhten Brechungsindex, schnell auf 5000 Einheiten über der Basislinie ein; Zu diesem Moment befindet sich kein Protein mehr auf der Polyacrylsäure-Bürste (Abb. 5.2-2). Nach Austausch der Salzlösung mit reiner Pufferlösung kehrt das SPR-Signal wieder auf die Basislinie zurück (Abb. 5.2-2). Es ist bemerkenswert, dass die Desorption von Lysozym, nach Spülen mit 500 mM NaCl Lösung, innerhalb von nur 1-2 Sekunden nahezu vollständig abgelaufen ist.

Es lohnt sich, die Adsorptionsrate von Lysozym an einer PAS-Bürste im Detail zu untersuchen. Wie in Abbildung 5.2-3A gesehen werden kann, steigt das SPR-Signal zu Beginn des Adsorptionsprozesses bei allen untersuchten Proteinkonzentrationen konstant an. Bestimmt man weiterhin die zugehörigen Adsorptionsraten aus den Steigungen der Messgraphen aus Abb. 5.2-3A und trägt diese gegen die verwendeten Konzentrationen auf, lässt sich ein linearer Zusammenhang finden (Abb. 5.2-3B).

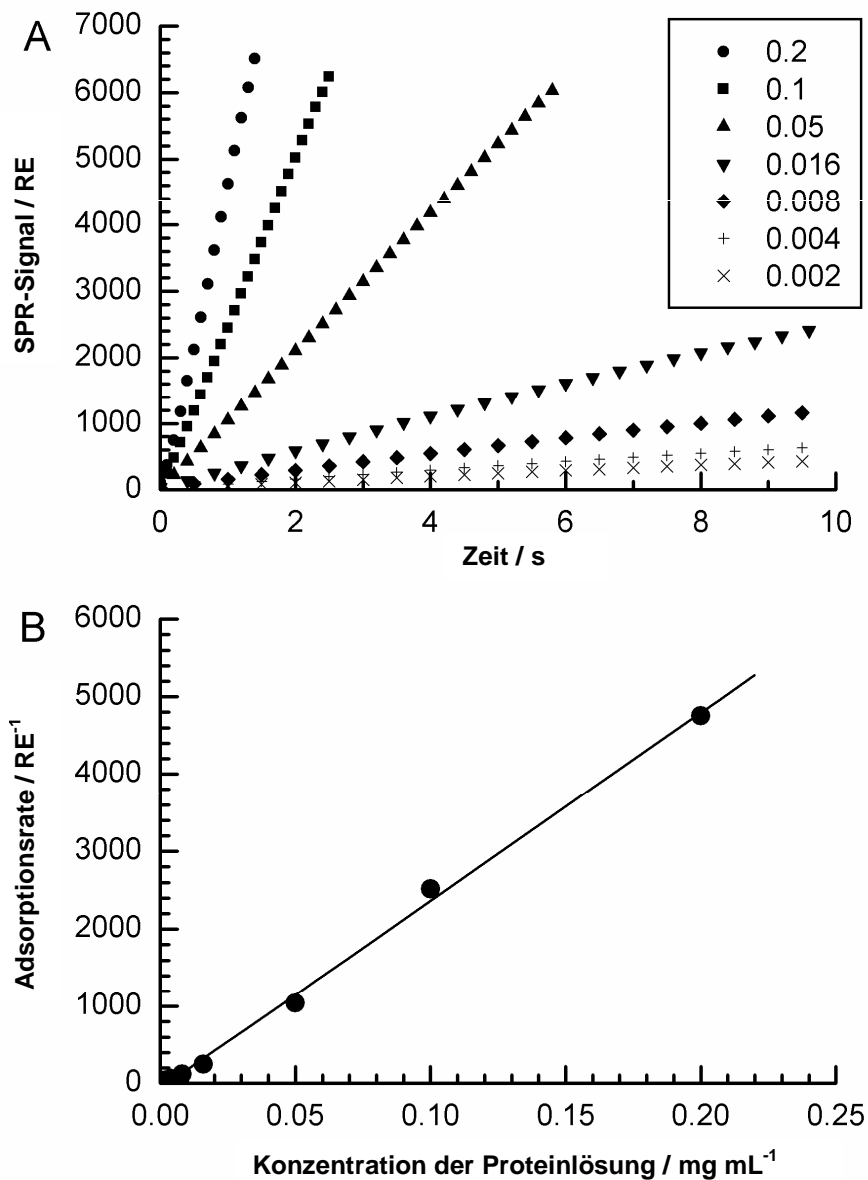


Abb. 5.2-3 A: Beginn der Adsorption von Lysozym auf einer PAS-Bürste als Funktion der Zeit. Die Proteinkonzentrationen sind in der Legende in der Einheit  $\text{mg mL}^{-1}$  gegeben. B: Adsorptionsrate als Funktion der Proteinkonzentration in der Probenlösung. Die Raten wurden mit den Daten aus Abbildung A berechnet.

Diese Analyse zeigt, dass die Anfangsgeschwindigkeit der Adsorption von Lysozym unabhängig vom Bedeckungsgrad der Polyacrylsäure-Bürste ist. Dieser Zusammenhang wäre mit einem diffusionskontrollierten Adsorptionsmechanismus vereinbar, bei dem die Anzahl der adsorbierenden Teilchen nur von der Anzahl der an die Oberfläche diffundierenden Teilchen begrenzt wird. Lysozym hat einen isoelektrischen Punkt von  $\text{pH} = 11.1$  [18] und trägt demnach bei  $\text{pH} = 7$  eine positive Nettoladung. Es ist wahrscheinlich, dass die positiven Ladungen von Lysozym direkt mit den negativen Ladungen der PAS-Bürste wechselwirken. Die Komplexbildung wird solange fortgeführt, bis keine Carboxylatgruppen mehr zur Verfügung stehen. Protein-Protein-Abstoßung, die sterischer- und elektrostatischer Natur sein kann, beginnt erst signifikant zu werden, wenn die Polyacrylsäure-Bürste weitgehend aufgefüllt ist. Dennoch könnte eine Aktivierungsbarriere existieren, die den Übergang von der Lösung in die Polyacrylsäure-Bürste limitiert [55]. Diese Barriere wäre zum Beispiel durch eine ungünstige Orientierung der Negativladungen des Proteins zu den Polyacrylsäureketten gegeben.

Es ist nun interessant, die Adsorptionskinetik von Lysozym mit der von BSA zu vergleichen. Der isoelektrische Punkt von BSA ist bei  $\text{pH} = 4.6$  [88] zu finden, woraus eine negative Nettoladung bei  $\text{pH} = 7$  resultiert. Dennoch verhindert diese Nettoladung nicht die Adsorption von BSA, wie sich in Abbildung 5.2-4 sehen lässt.

Bei Kontakt der PAS-Bürste mit BSA-Lösung lässt sich ein Anstieg des SPR-Signals beobachten. Bei einer Konzentration von  $0.1 \text{ g/L}$  beispielsweise, misst man nach 10 Minuten etwa 500 relative Einheiten über der Basislinie, die etwa  $0.5 \text{ mg m}^{-2}$  adsorbierter Masse entsprechen. Konsistent mit diesem Wert ist eine genaue Messung der Oberflächenkonzentration von BSA auf PAS-Bürsten mit Hilfe der Neutronenreflektometrie. Dabei wurde bei leicht niedrigerem  $\text{pH}$ , ein Wert von  $1.5 \text{ mg m}^{-2}$  bestimmt [46, 56]. Der geringere Adsorptionsgrad von BSA im Vergleich zu Lysozym kommt höchstwahrscheinlich durch die entgegengesetzten Nettoladungen dieser Proteine zustande.

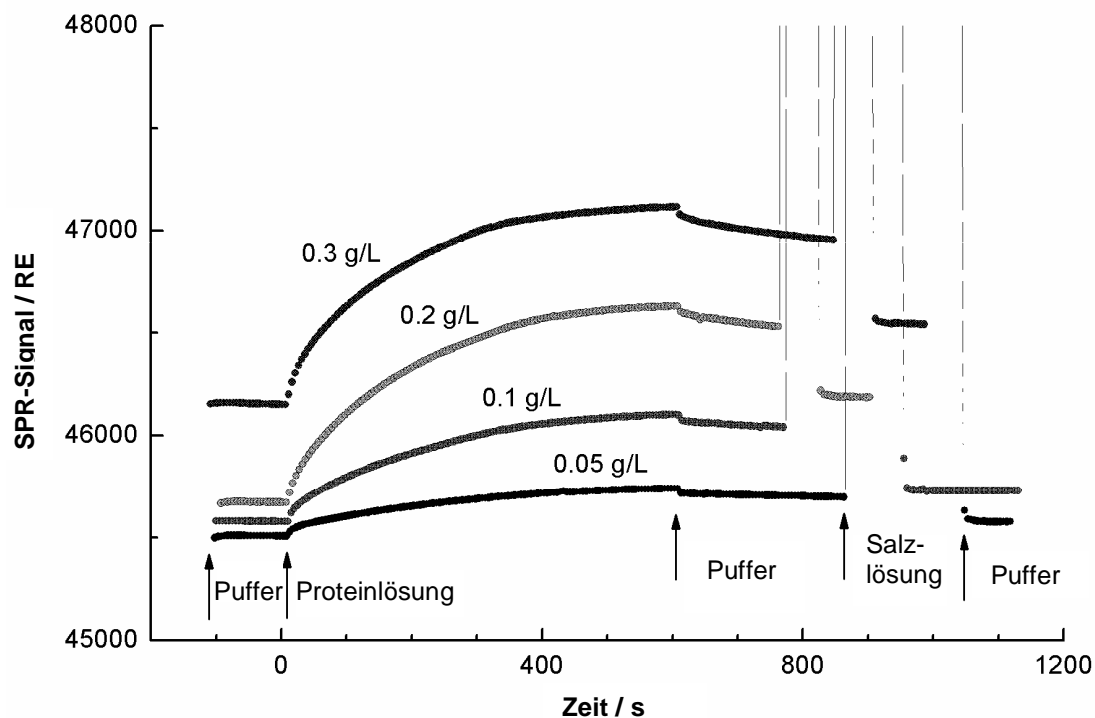


Abb. 5.2-4 SPR-Daten zur Adsorption von BSA an einer Polyacrylsäurebürste. Die Pufferlösung wurde auf pH = 7 eingestellt. Proteinkonzentrationen sind im Diagramm angegeben. Proteindesorption wurde durch Spülen mit reiner Pufferlösung und 500 mM NaCl-Pufferlösung erreicht. Die NaCl-Pufferlösung verursacht hierbei den sehr starken Anstieg des SPR-Signals um etwa 5000 RE.

Offensichtlich wirkt sich der Unterschied in der Nettoladung ebenfalls stark auf die Geschwindigkeit der Proteinadsorption an einer Polyacrylsäure-Bürste aus: Im Gegensatz zu Lysozym ist die Adsorption von BSA ein sehr langsamer Prozess. Während Lysozym innerhalb von 5 Sekunden aus einer 0.1 g L<sup>-1</sup>-Proteinlösung einen Plateau-Wert ausbildet (Abb. 5.2-2), benötigt BSA aus einer Lösung mit der gleichen Proteinkonzentration mehrere Minuten (Abb. 5.2-4). Hingegen hat das Spülen mit reiner Pufferlösung, wie schon bei Lysozym, nur einen geringen Effekt auf die Desorption von BSA (Abb. 5.2-4), was auf einen hohen Anteil von irreversibel gebundenem BSA hinweist. Ein nachfolgendes Spülen mit 500 mM NaCl-Pufferlösung verursacht einen starken Anstieg im SPR-

Signal, da die Anwesenheit von gelöstem Salz den Brechungsindex der Probenlösung deutlich stärker ändert, als die Anwesenheit von adsorbiertem BSA. Nach einem letzten Spülen mit reiner Pufferlösung geht das SPR-Signal wieder auf einen niedrigen Wert zurück. Bei  $0.1 \text{ g L}^{-1}$  weist das SPR-Signal auf eine nahezu vollständige Desorption hin (Abb. 5.2-4). Die Änderung im SPR-Signal, nachdem die NaCl-Pufferlösung zugegeben wurde, kann dabei als Hauptdesorptionsschritt betrachtet werden. Wie bei Lysozym gefunden wurde, ist auch bei BSA die Signaländerung sehr schnell und findet innerhalb von Sekunden statt. Es sieht deshalb danach aus, dass die Desorption von Lysozym und BSA nach Erhöhung der Ionenstärke nicht durch eine einfache Abschirmung der elektrostatischen Wechselwirkungen verursacht worden ist. Dagegen ist es wahrscheinlich, dass bei Erhöhung der Ionenstärke ein teilweiser Kollaps der PAS-Bürste das Protein schnell aus der Bürste drängt.

In Abb. 5.2-5 sind die ersten Sekunden der Adsorption von BSA auf einer Polyacrylsäure-Bürste zu sehen. Im Gegensatz zu Lysozym ist der Anstieg der adsorbierten Masse nicht linear, und deshalb ist auch kein diffusionskontrollierter Adsorptionsmechanismus anzunehmen. Offensichtlich beeinflussen schon die ersten adsorbierten Proteine die Adsorptionsrate von BSA. Eine einfache Erklärung wären direkte Protein-Protein-Abstossungskräfte, die jedoch bei Lysozym ebenfalls vorhanden sein müssten. Stattdessen könnte die Adsorption von negativ geladenen Proteinen auf einer Polyacrylsäurebürste sensitiv auf kleine Änderungen in der chemischen Umgebung, wie pH-Wert und Ionenstärke, sein.

Demnach sieht es danach aus, dass Lysozym mit einer positiven Nettoladung und BSA mit einer negativen Nettoladung unterschiedlichen Adsorptionsmechanismen folgen.

Die Schlüsselaspekte, die für einem passenden Adsorptionsmechanismus berücksichtigt werden müssten, beinhalten ein hohes Maß an Proteinadsorption bei niedrigen Ionenstärken (im Bereich von  $10 \text{ mM}$ ), ein niedriges Adsorptionsmaß

bei Ionenstärken von wenigen 100 mM, Proteinadsorption bei pH-Werten, die sogar wenige Einheiten über dem isoelektrischen Punkt des Proteins sind, und Irreversibilität des Adsorptionsprozesses nach einer genügend hohen Adsorptionszeit (von wenigen Minuten bis Stunden).

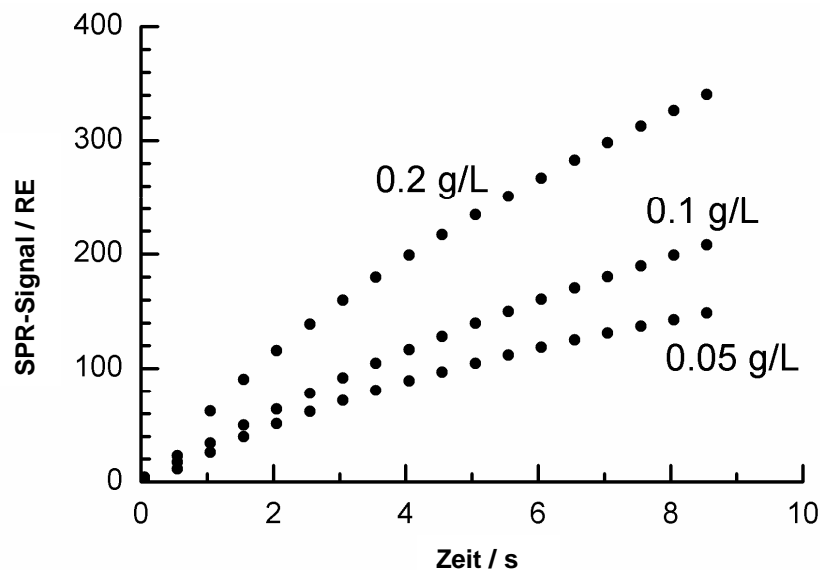


Abb. 5.2-5 Beginn der Adsorption von BSA an einer Polyacrylsäure-Bürste.

Ist die Nettoladung des Proteins positiv (wie z.B. Lysozym bei  $\text{pH} = 7$ ), wird elektrostatische Anziehung zu den negativ geladenen Polyacrylsäure-Ketten die Haupttriebkraft der Adsorption sein. Eine Erhöhung der Ionenstärke der Lösung resultiert in einer Abnahme der Debye-Länge und dadurch zu einem kleineren Adsorptionsausmaß (Abb. 5.2-2). Ist die Nettoladung des Proteins negativ (wie BSA bei  $\text{pH} = 7$ ), führt eine Erhöhung der Ionenstärke ebenfalls zu einer Verringerung des Bedeckungsgrades (Abb. 5.2-4). In diesem Fall könnte man argumentieren, dass es immer positiv geladene Bereiche auf einer Protein-oberfläche gibt, auch wenn die Nettoladung negativ ist. Wie schon von Ballauff und Mitarbeitern diskutiert wurde, werden positiv geladene Bereiche des Proteins mit den negativ geladenen Polyacrylsäureketten wechselwirken. Eine begleitende Freilassung von monovalenten Gegenionen erhöht die Entropie des Systems



und liefert dadurch den nötigen Gewinn an freier Energie [57, 58]. Nach dieser Ansicht wäre der Interaktionsmechanismus von Proteinen mit einer Polyacrylsäurebürste, für positive wie auch negative Nettoladungen, der gleiche. Diese Sichtweise wird auch von Modellberechnungen bestätigt [59]. Eine andere Erklärung wurde von Biesheuvel und Mitarbeitern vorgestellt [60, 61]. In dieser wird eine Ladungsumkehr des Proteins gefordert, die aufgrund eines niedrigeren pH-Wertes innerhalb der Bürsten, im Vergleich zur Lösung, zustande kommt. Die Umkehr wird durch die schwachen Säure- und Basenreste der Seitenketten verursacht, die in der Lage sind Protonen aufzunehmen. Als Folge ergibt sich eine elektrostatisch attraktive Wechselwirkung zwischen dem Protein und der Bürste. Erste Modellrechnungen ergeben jedoch eine zu starke Abhängigkeit der Ionenstärke und des pH-Wertes auf den Adsorptionsgrad von BSA, die nicht konsistent mit den experimentell erhaltenen Daten sind. Dennoch ist zu bemerken, dass das Modell unterschiedliche Adsorptionsmechanismen für positiv und negativ geladene Proteine vorhersieht (die letzteren untergehen einer Ladungsumkehr), und dass es nur auf der Nettoladung des Proteins basiert. Ein weiteres Modell für die Adsorption von negativ geladenem BSA auf einer PAS-Bürste wurde von von Grünberg aufgestellt [46]. Hier werden nach Adsorption des Proteins die positiv geladenen Gegenionen des Proteins von der Proteinoberfläche in die Bürste freigesetzt. Dies wird durch eine hohe Konzentration an positiven Ionen in der Bürste, im Vergleich zur Lösung, erklärt, so dass weniger positive Gegenionen notwendig werden, um die negative Proteinladung auszugleichen. Mit anderen Worten, ähnelt das negative Oberflächenpotential des Proteins innerhalb der Bürste dem Donnan-Potential. Die Freisetzung der Gegenionen innerhalb der Bürste ist somit Triebkraft der Adsorption von BSA an einer PAS-Bürste. Selbstverständlich kann dieses Modell nur auf negativ geladene Proteine angewendet werden.

Wie bereits erwähnt, deuten die SPR-Daten auf einen Adsorptionsmechanismus hin, der zwischen positiven und negativen Nettoladungen unterscheidet, wozu nur die beiden ersten genannten Modelle passen. Trotzdem ist es möglich, dass alle beschriebenen Modelle einen Teil der erfassten Messergebnisse sinnvoll

beschreiben: Bei pH-Werten nahe dem isoelektrischen Punkt wird Ladungsumkehr der negativen Proteinladungen sicherlich effektiv sein. Bei höheren pH-Werten könnten positiv geladene Bereiche der Proteinoberfläche als Gegenionen für die PAS-Ketten wirken, während die Gegenionen der negativ geladenen Bereiche in die PAS-Bürste freigesetzt werden. Demgegenüber ist bei pH-Werten unterhalb des isoelektrischen Punktes des Proteins Komplexbildung zwischen dem Protein und der Bürste mit begleitender Gegenionfreisetzung die wesentliche Art der Wechselwirkung.

## 5.3 Neutronenstreuexperimente

### 5.3.1 Experimente zur Adsorption von $\alpha$ -LA an einer PAS-Bürste [101]

Die Neutronenreflektometrie-Experimente wurden bei 20 und 40°C durchgeführt. Für jede Temperatur wurde ein anderer Si-Wafer vorbereitet und verwendet. In Abbildung 5.3-1 sind die normalisierten Neutronenreflektivitätskurven der beiden Proben mit einer Si / dPS / dPSPAS / Lösung - Grenzfläche, wie sie im Experiment erhalten wurden, dargestellt.

Um die Änderungen in den Reflektivitäten aufgrund von Proteinadsorption sichtbar zu machen, wurden die Kurven auf die Reflektivität einer glatten Si / D<sub>2</sub>O Grenzfläche normalisiert. Da alle Probenlösungen mit D<sub>2</sub>O präpariert wurden und D<sub>2</sub>O etwa die gleiche Streulängendichte wie dPS hat, können die beobachteten Oszillationen der Gegenwart einer PAS-Bürste zugeschrieben werden.

In Gegenwart von  $\alpha$ -LA, in einer Konzentration von 0.1 mg mL<sup>-1</sup>, werden signifikante Änderungen in den Reflektivitätskurven beobachtet, was deutlich zeigt, dass  $\alpha$ -LA bei 20 und 40°C auf einer PAS-Bürste adsorbiert (Abb. 5.3-1).

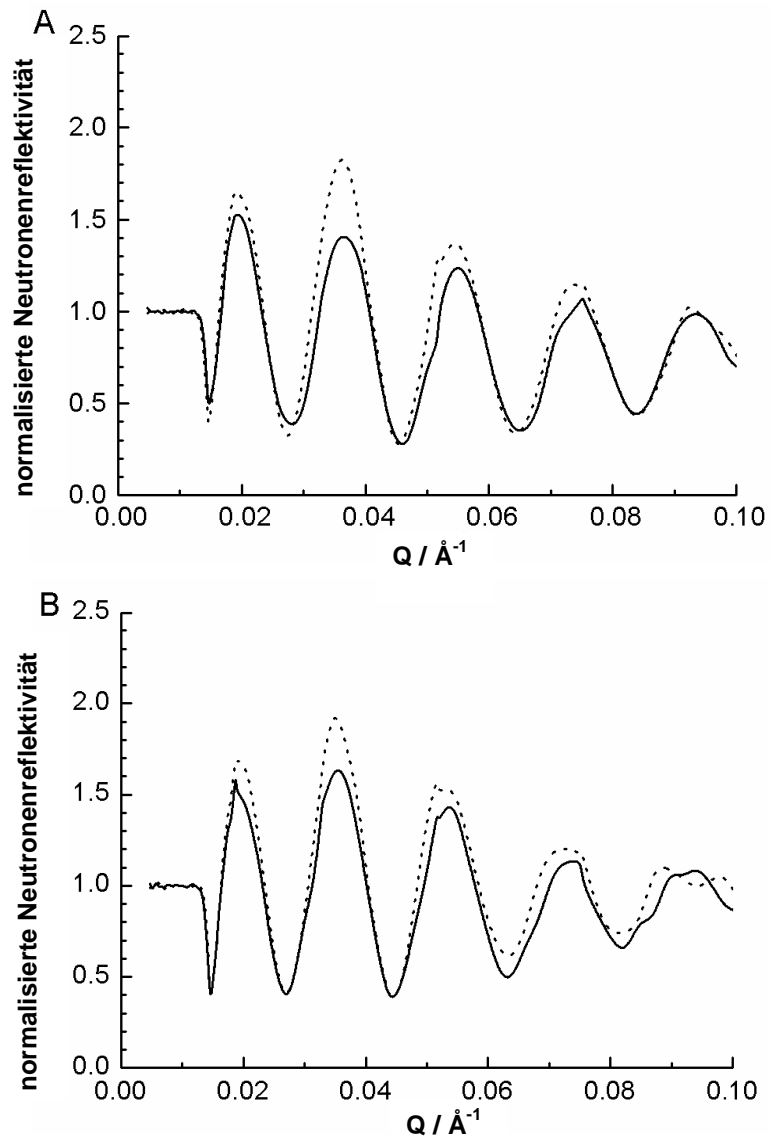


Abb. 5.3-1 Neutronenreflektivitätskurven an einer Si / dPS / dPSPAS / Lösung-Grenzfläche bei 20 °C (Diagramm A) und 40 °C (Diagramm B). Die Kurven wurden auf die Neutronenreflektivität einer glatten Si / D<sub>2</sub>O - Grenzfläche normalisiert, um Änderungen in der Reflektivität sichtbar zu machen. Die feste Linie zeigt die Daten, wie sie ohne Protein erhalten wurden, und die gepunktete Linie zeigt die Daten, wie sie in Gegenwart von  $\alpha$ -LA in einer Konzentration von 0.1 mg mL<sup>-1</sup> erhalten wurden.

Um die erhaltenen Neutronenreflektivitätsdaten in Bezug auf die Grenzflächenstruktur zu analysieren, müssen berechnete Reflektivitätskurven an die experimentell erhaltenen Daten angefitet werden. In dieser Studie basieren die Berechnungen auf einem Schichtenmodell. Jede Schicht ist charakterisiert durch ihre Dicke  $d_i$  und ihre Streulängendichte  $\rho_i$ . Zusätzlich wird eine Rauigkeit  $\sigma_{i, i+1}$  zwischen den Schichten angenommen, um eine graduelle Änderung in der Streulängendichte beim Wechsel von Schicht zu Schicht zu simulieren. Die erste Schicht des Strukturmodells stellt der dPS-Film auf dem Si-Wafer dar. Seine Dicke,  $d_1$ , ist ein Fit-Parameter, während die Streulängendichte mit  $\rho_1 = 6.2 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  bekannt ist. Es ist zu beachten, dass die Enden der dPS-Ketten des Copolymers, in der Schicht inbegriffen sind und deshalb im Streulängendichteprofil nicht zu sehen sind, was eine merkliche Verbesserung gegenüber früheren Studien [46, 56] darstellt (siehe Abschnitt 5.3.2, S.68). Um die PAS-Bürste zu modellieren, wurde eine einfache Analyse herangezogen und diese Region in sieben Schichten eingeteilt, wobei jede Schicht eine festgelegte Dicke von  $30 \text{ \AA}$  ( $d_2, \dots, d_8$ ) erhielt und die zugehörigen Streulängendichten ( $\rho_2, \dots, \rho_8$ ) jedoch als variabel festgelegt wurden. Eine größere Anzahl an Schichten war nicht notwendig und ergab auch keine eindeutigen Streulängendichteprofile mehr. Die Rauigkeiten zwischen den Schichten wurden bis auf die der Si / dPS-Schicht, die ebenfalls als Fit-Parameter verwendet wurde, auf  $7 \text{ \AA}$  gesetzt. Somit ergeben sich neun Fit-Parameter ( $d_1, \rho_2, \dots, \rho_8, \sigma_{0,1}$ ). Für den Si-Wafer und die Probenlösungen wurde die Streulängendichte  $\rho_0 = 2.07 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  beziehungsweise  $\rho_9 = 6.37 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  verwendet. Der letztere Wert wurde beim Fitten der Daten, die bei  $40^\circ\text{C}$  erhalten wurden, leicht erniedrigt.

In Abbildung 5.3-2 sind die gefitteten Reflektivitätskurven zusammen mit den experimentellen Daten zu sehen. Im Allgemeinen sind die experimentell erhaltenen Neutronenreflektivitätskurven gut durch die Fits reproduziert, was die Signifikanz der entsprechenden Streulängendichteprofile (SLD), die in Abbildung 5.3-3 zu sehen sind, bekräftigt. Aus dem Fit bei  $20^\circ\text{C}$  wurde eine Dicke für den dPS-Film von  $281 \text{ \AA}$  erhalten (Abb. 5.3.3A). In Abwesenheit von Protein, findet sich ein lokales Minimum bei  $325 \text{ \AA}$ , das dem Maximum der PAS-Konzentration

entspricht. In Gegenwart von  $\alpha$ -LA, verschiebt sich das SLD-Profil über die gesamte Region der PAS-Bürste zu kleineren Streulängendichten, woraus sich eine breite, räumliche Verteilung des Proteins innerhalb der PAS-Bürste ableiten lässt. Der Wafer, der bei 40°C verwendet wurde, hat eine sehr ähnliche Struktur (Abb.5.3.3B), was eine hohe Reproduzierbarkeit der PAS-Bürstenpräparation dokumentiert. Hier hat der dPS-Film eine Dicke von 295 Å und das Maximum der Konzentration an PAS ist bei 340 Å zu finden. Bei Zugabe von  $\alpha$ -LA-Lösung verschiebt sich das SLD-Profil über die gesamte Länge der Bürste zu kleineren Streulängendichten, was konsistent mit einer breiten, räumlichen Verteilung adsorbierter Proteinmoleküle innerhalb der PAS-Bürste ist. Dennoch ist die Änderung im SLD-Profil bei 40°C kleiner, was auf einen kleineren Adsorptionsgrad bei höherer Temperatur schließen lässt.

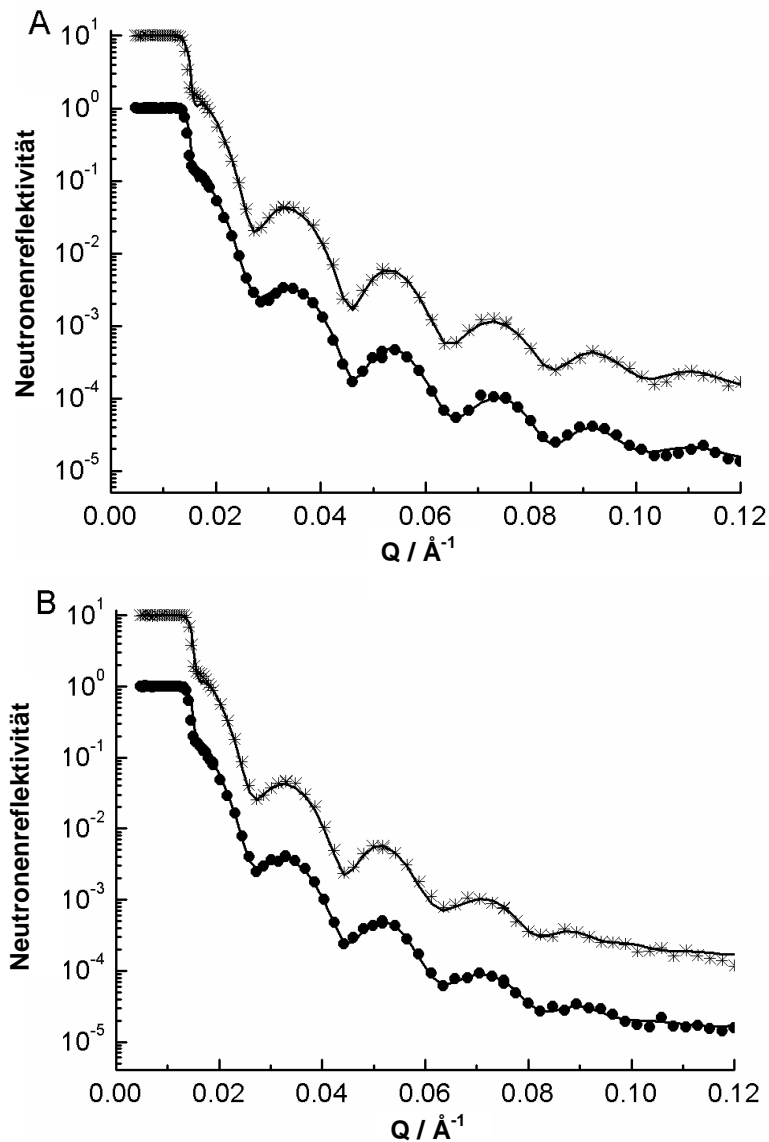


Abb. 5.3-2 Neutronenreflektivitätskurven einer Si / dPS / dPSPAS / Lösung - Grenzfläche bei 20 °C (Diagramm A) und 40 °C (Diagramm B). Daten die in Abwesenheit von Protein erhalten wurden, entsprechen den ausgefüllten Kreisen; Daten die mit Lösungen von  $\alpha$ -LA der Konzentration  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  erhalten wurden, entsprechen den Sternen. Die Letzteren sind zur Übersichtlichkeit um den Faktor 10 verschoben worden. Fits sind auf Grundlage eines Strukturmodells als feste Linien dargestellt.

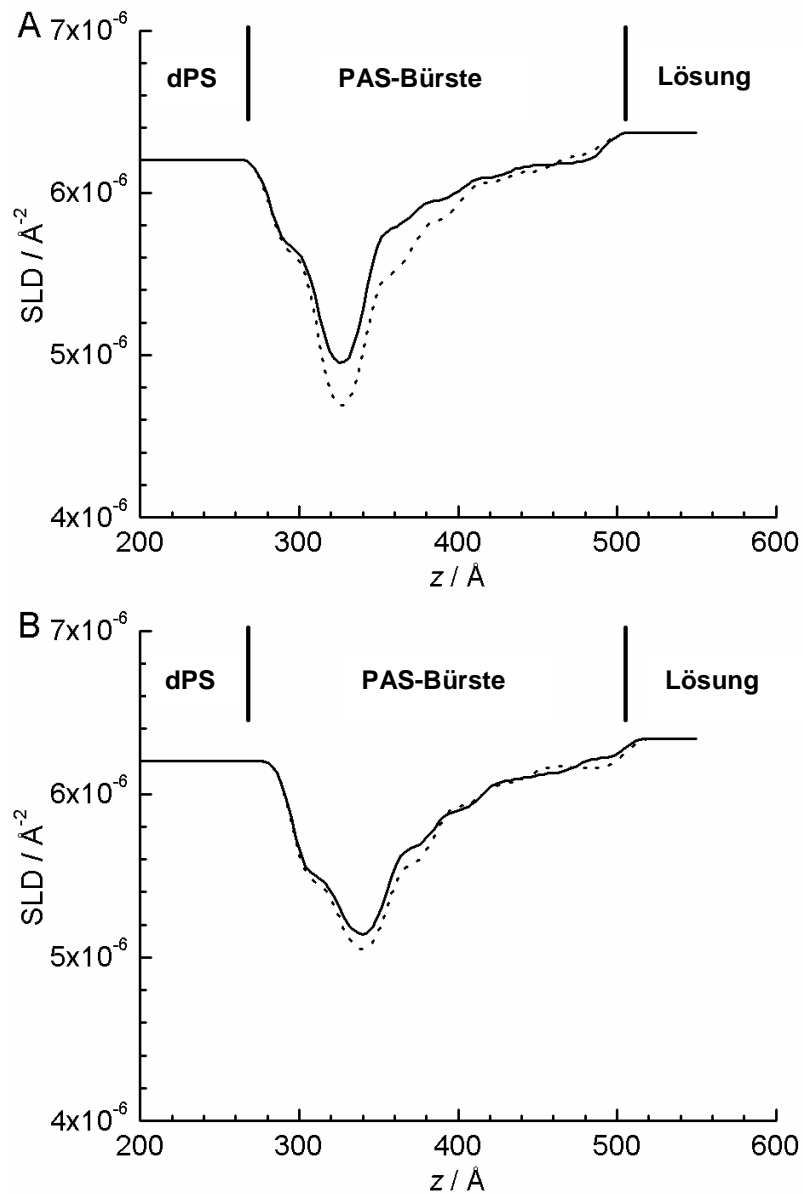


Abb. 5.3-3 Streulängendichteprofile (SLD) einer Si / dPS / dPSPAS / Lösung Grenzfläche bei 20 °C (Diagramm A) und 40 °C (Diagramm B). Die durchgezogenen Linien zeigen Profile, die in Abwesenheit von  $\alpha$ -LA erhalten wurden, gestrichelte Linien zeigen Profile, die in Anwesenheit von  $\alpha$ -LA in einer Konzentration von  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  erhalten wurden. Die Si-Oberfläche liegt bei  $z = 0$ .

Die erhaltenen Streulängendichteprofile lassen sich in Volumenbruchprofile konvertieren, wenn vorausgesetzt wird, dass bei Adsorption von  $\alpha$ -LA nur ein Austausch von Grenzflächenwasser ( $D_2O$ ) gegen Proteinmoleküle stattfindet. Das gesamte SLD-Profil lässt sich dann als die Summe der SLDs,  $\rho_j$ , der Einzelkomponenten, gewichtet mit ihren Volumenanteilen  $\phi_j$ , nach Gleichung (5.3-1) schreiben:

$$SLD = \phi_{PAS} \rho_{PAS} + \phi_{\alpha LA} \rho_{\alpha LA} + (1 - \phi_{PAS} - \phi_{\alpha LA}) \rho_{D_2O} \quad (5.3-1)$$

Mit dieser allgemeinen Gleichung lässt sich der Volumenbruch,  $\phi_{\alpha-LA}$ , als Funktion von  $z$  wie folgt berechnen:

$$\phi_{\alpha LA} = \frac{SLD_{mit \alpha LA} - SLD_{ohne \alpha LA}}{\rho_{\alpha LA} - \rho_{D_2O}} \quad (5.3-2)$$

wobei  $SLD_{mit \alpha-LA}$  und  $SLD_{ohne \alpha-LA}$  die Streulängendichten als Funktion von  $z$  in An- und Abwesenheit von Protein sind, wie man sie in Abbildung 5.3-3 sehen kann. Die Streulängendichte eines  $\alpha$ -LA-Moleküls,  $\rho_{\alpha LA}$ , wurde zu  $3.22 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  berechnet. Verwendet wurde dabei die Struktur aus der PDB-Datei 1HFZ [24], die Streulängen, die vom amerikanischen *National Institute of Standards and Technology* (NIST) [62] veröffentlicht wurden, und ein spezifisches Volumen von  $0.736 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  [63]. Eine molare Masse von  $14178 \text{ g mol}^{-1}$  wurde aus der Primärstruktur des Proteins berechnet. In gleicher Art und Weise wird  $\phi_{PAS}$  als Funktion von  $z$  aus der folgenden Gleichung erhalten:

$$\phi_{PAA} = \frac{SLD_{ohne \alpha LA} - SLD_{Si|dPS|D_2O}}{\rho_{PAA} - \rho_{D_2O}} \quad (5.3-3)$$

Hierbei ist  $SLD_{ohne \alpha-LA}$  wiederum aus Abbildung 5.3-3 entnommen worden, und  $SLD_{Si|dPS|D_2O}$  ist ein berechnetes Streulängendichteprofil einer imaginären Grenzfläche, dessen dPS-Film erhalten blieb. Das PAS wurde jedoch durch  $D_2O$



ersetzt. Die Streulängendichte eines PAS-Moleküls,  $\rho_{\text{PAS}}$ , wurde zu  $3.29 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  berechnet. Dabei wurde ein molares Volumen von  $49.44 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$  angenommen [64]. Schließlich wurde der Volumenbruch von dPS,  $\phi_{\text{dPS}}$ , als Funktion von  $z$  erhalten, indem sein Wert über die gesamte dPS Filmdicke als eins angenommen wurde, und in allen anderen Bereichen wurde er gleich Null gesetzt. Die Werte für die Rauigkeiten, wie sie aus den Fits erhalten wurden, sind hierbei berücksichtigt. Alle Volumenanteile, die nach dieser Art bestimmt wurden, sind in Abb. 5.3-4 aufgetragen.

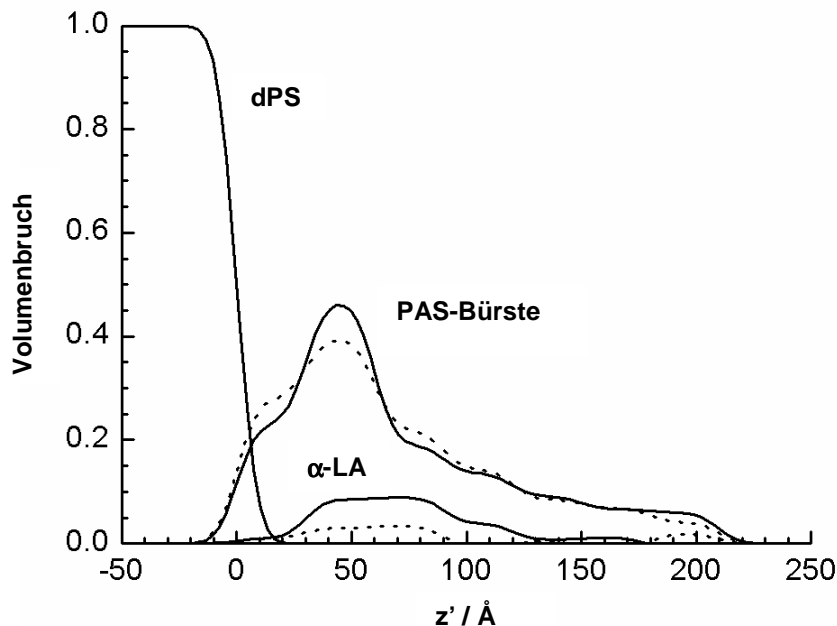


Abb. 5.3-4 Volumenbruchprofile verschiedener Komponenten des untersuchten Grenzflächensystems. Die durchgezogenen und gestrichelten Linien zeigen verschiedene Proben, die bei 20 und 40°C untersucht wurden. Die  $z$ -Skala von Abb. 5.3-3 wurde für beide dPS-Oberflächen bei 20 und 40°C auf  $z' = 0$  versetzt. Der Wasservolumenanteil bei 20 und 40°C ergibt sich aus dem restlichen Volumenanteil.

Da die beiden Proben bei 20 und 40°C eine leicht unterschiedliche dPS-Filmdicke aufweisen, wurde der Ursprung der z-Achse, wie sie in Abbildung 5.3-3 verwendet wird, auf die dPS-Film-Oberfläche wie sie Abbildung 5.3-4 zu sehen ist, versetzt. Dadurch wird der direkte Vergleich der PAS- und Proteinvolumenbrüche der beiden Proben möglich. Wie in Abbildung 5.3.4 zu sehen ist, ist das Maximum des PAS-Volumenanteils bei beiden Temperaturen in einem Abstand von etwa 50 Å zur dPS-Film-Oberfläche zu finden. Bei 40°C erscheint die PAS-Verteilung etwas verbreitert. Durch Integration über den Volumenanteil lässt sich die PAS-Bürstendichte nach folgender Gleichung berechnen:

$$\sigma = \frac{N_A}{222 V_{PAS}} \times \int \varphi_{PAS} dz' \quad (5.3-4)$$

$N_A$  entspricht hierbei der Avogadro-Konstante, 222 ist die durchschnittliche Zahl an Monomeren der PAS-Ketten, und  $V_{PAS}$  ist das molare Volumen der PAS-Monomere. Für 20 und 40°C erhält man eine Bürstendichte von  $0.2 \text{ nm}^{-2}$ , was zeigt, dass beide Proben auf die gleiche Art präpariert wurden. Wird von einer zweidimensionalen hexagonalen Packung der PAS-Ketten ausgegangen, entspricht eine Bürstendichte von  $0.2 \text{ nm}^{-2}$  einem durchschnittlichen Kettenabstand von 2.4 nm. Selbstverständlich ist dieser Abstand kleiner an Stellen, wo der PAS-Volumenbruchanteil sein Maximum hat und deutlich größer an der inneren und äußeren Grenzfläche der PAS-Bürste, wo die PAS-Ketten hochverdünnt vorliegen (Abbildung 5.3-4). Ein durchschnittlicher PAS-Kettenabstand von 2.4 nm ist vergleichbar mit der Größe eines  $\alpha$ -LA Moleküls, dessen Stokes-Radius bei 1.9 nm liegt [64].

Der Volumenbruch von  $\alpha$ -LA bei 20°C erstreckt sich von  $z'=20 \text{ Å}$  bis  $130 \text{ Å}$  mit einem Maximum des Volumenbruchs von 0.1 (Abb. 5.3-4). Dies ist ein bemerkenswertes Ergebnis, da es deutlich zeigt, dass die  $\alpha$ -LA-Moleküle nur mit den PAS-Ketten wechselwirken. Es gibt keine bevorzugte Wechselwirkung mit den äußeren oder inneren Grenzflächen der PAS-Bürste. Aus diesem Grund ist die Adsorption von  $\alpha$ -LA an einer PAS-Bürste offensichtlich kein Ergebnis einer

hydrophoben Wechselwirkung mit dem dPS-Film. Obwohl  $\alpha$ -LA eine negative Nettoladung bei einem pD von 6.7 besitzt (der isoelektrische Punkt von  $\alpha$ -LA ist bei pH = 4.5 [34]), dringt  $\alpha$ -LA in die negativ geladene PAS-Bürste ein bis es völlig von negativen Ladungen umgeben ist. Es ist außerdem zu bemerken, dass es keine Ansammlung von  $\alpha$ -LA an der Grenzfläche Bürste-Lösung gibt (Abb.5.3-4), die eine selektive Interaktion zwischen einem positiv geladenen Bereich eines  $\alpha$ -LA-Moleküls und den negativ geladenen PAS-Ketten erlauben würde. Ähnliche Ergebnisse wurden in früheren Studien für das Protein Rinder-Serum-Albumin erzielt (BSA, siehe unten), das ebenfalls eine negative Nettoladung trug [46, 56, 59].

Allerdings ist in diesen Studien [46, 56] die Struktur der dPS-Film-PAS-Bürste Grenzfläche nicht gut aufgelöst, da ein undeutertes Copolymer PSPAS für die Präparation der PAS-Bürsten verwendet wurde. Anzumerken ist, dass sich BSA und Ribonuclease A-Moleküle in sphärischen PAS Bürsten ebenfalls verteilen. Dies wurde in einer Kleinwinkel-Röntgenstreuungsstudie berichtet [61], was die Aussagen der hier aufgeführten Proteinprofile bestätigt.

Um die Gesamtmasse an adsorbiertem  $\alpha$ -LA zu berechnen, wurde eine Integration über den gesamten Volumenbruch von  $\alpha$ -LA durchgeführt (Abb. 5.3-4):

$$\Gamma = \frac{M_{\alpha LA}}{V_{\alpha LA}} \times \int \phi_{\alpha LA} dz' \quad (5.3-5)$$

$M_{\alpha LA}$  und  $V_{\alpha LA}$  sind hierbei die molare Masse und das molare Volumen von  $\alpha$ -LA. Bei 20°C erhält man eine adsorbierte Masse von  $\Gamma = 0.93 \text{ mg m}^{-2}$ . Dieser Wert ist kleiner als der, den man für BSA findet ( $1.4 \text{ mg m}^{-2}$ ) [46, 56]. In dieser Studie ist jedoch der pD-Wert mehr als zwei Einheiten über dem isoelektrischen Punkt von  $\alpha$ -LA, was eine starke elektrostatische Abstoßung zwischen einem sich annähernden  $\alpha$ -LA-Molekül und einer PAS-Bürste verursacht. Wendet man Gleichung (5.3-5) auf die Probe bei 40°C (Abb. 5.3. 4) an, wird eine geringere adsorbierte Menge von nur  $0.33 \text{ mg m}^{-2}$  gefunden. Aus thermodynamischer Sicht

ist die Abnahme des Adsorptionsgrades nach Erhöhung der Temperatur mit einer exothermen Adsorption von  $\alpha$ -LA an einer PAS-Bürste erklärbar. Dies wäre konsistent mit einer bevorzugt elektrostatischen Wechselwirkung positiv geladener Bereiche der Proteinoberfläche mit den negativ geladenen PAS-Ketten ( $\Delta H < 0$ ). In diesem Fall würde das Protein zu einem multivalenten Gegenion werden und eine Freilassung von monovalenten Gegenionen würde als zusätzliche Triebkraft für die Adsorption ( $\Delta S > 0$ ) [58,59] wirken. Diese Gegenion-freisetzung wäre wichtig, um jegliche Abstossungskräfte zwischen dem Protein und den PAS-Ketten überkompensieren zu können.

### 5.3.2 Experimente zur Adsorption von BSA an einer PAS-Bürste

In Abbildung 5.3-5 ist eine Neutronen-Reflektivitätskurve einer Si / d-PS / PSPAS / D<sub>2</sub>O-Puffer-Grenzfläche bei 20°C abgebildet. D<sub>2</sub>O hat eine Streulängendichte von  $6.37 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ , die sehr ähnlich zu der des d-PS-Films ist ( $6.2 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ ). Die d-PS Schicht ist also kontrastangepasst zur Lösung, woraus eine glatte Reflektivitätskurve zu erwarten wäre, wenn keine andere Komponente anwesend ist. Dennoch werden ausgeprägte Oszillationen beobachtet, die deutlich zeigen, dass eine PAS-Bürste von den PSPAS Molekülen gebildet wurde. Die PSPAS Moleküle sind nicht perdeutert und haben eine signifikant kleinere Streulängendichte als D<sub>2</sub>O. Ein undeutertes Copolymer hilft bei der Lokalisierung der PAS-Bürste im Streulängendichteprofil. Neben D<sub>2</sub>O als Lösungsmittel wurden Proben mit einer Mischung aus 75% D<sub>2</sub>O und 25% H<sub>2</sub>O präpariert, die im Folgenden als HDO bezeichnet werden. Durch den H<sub>2</sub>O-Zusatz wird die Streulängendichte des Lösungsmittels von  $6.37 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  auf  $4.64 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  herabgesenkt. Diese Veränderung im Kontrast führt zu einer veränderten Neutronenreflektivitätskurve (Abb. 5.3-5). Mit zwei Neutronenreflektivitätskurven basiert die Strukturbestimmung auf zwei unterschiedlichen Streulängendichten und ist deshalb weniger zweideutig.

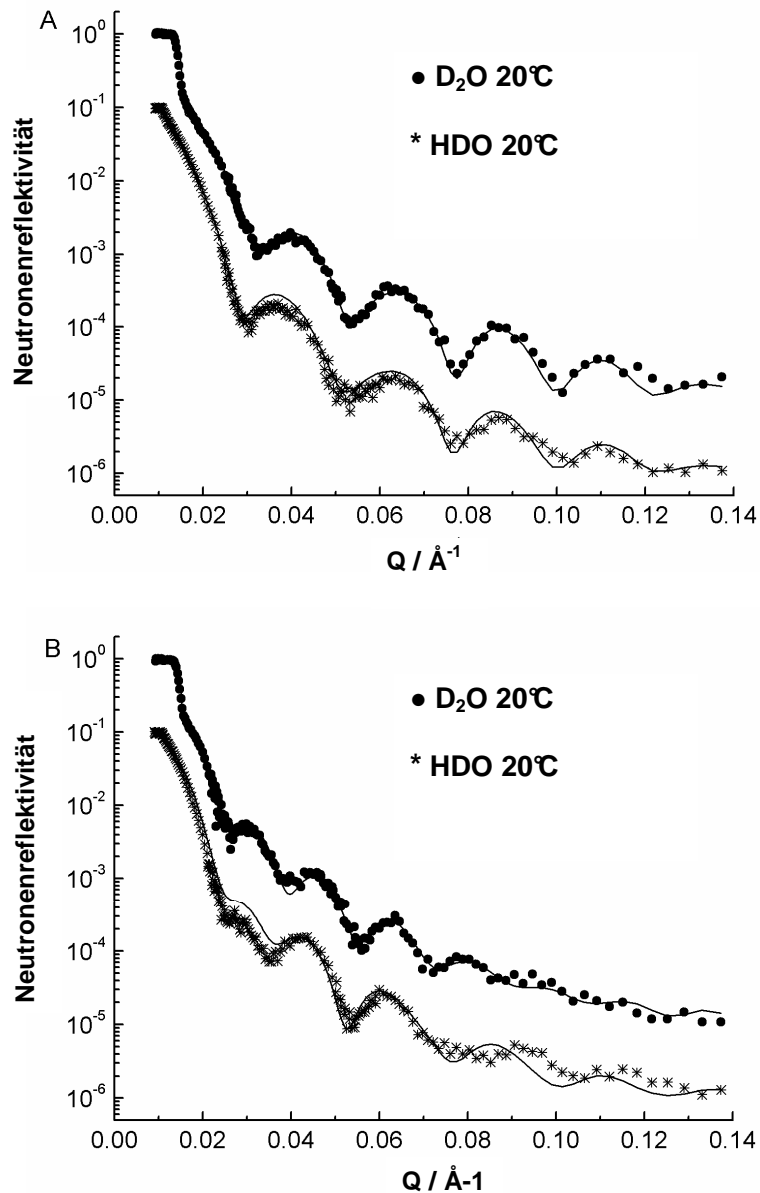


Abb. 5.3-5 Neutronenreflektivitätskurven einer Si / d-PS / PSPAS / Puffer-lösung-Grenzfläche. Die Pufferlösung wurde entweder mit reinem  $\text{D}_2\text{O}$  oder einer Mischung aus 75%  $\text{D}_2\text{O}$  und 25%  $\text{H}_2\text{O}$  (HDO) präpariert. In Abbildung A sind die Kurven, die bei 20°C erhalten wurden, aufgezeigt. Abbildung B zeigt die Probe, nachdem sie für 12 Stunden auf 40°C erhitzt wurde, anschließend auf 20°C abgekühlt und dann gemessen wurde. Die Symbole entsprechen den experimentellen Daten und die festen Linien sind Fits eines Schichtenmodells. Die HDO-Kurven wurden um den Faktor 0.1 verschoben.

Da der Einfluss der Temperatur auf die Proteinadsorption an einer PAS-Bürste studiert werden sollte, wurde das Verhalten der PAS-Bürste auf Temperaturänderung zuerst untersucht. Die Bürste wurde dazu in Gegenwart von reiner Pufferlösung von 20 auf 40°C für 12 Stunden erhitzt und dann wieder auf 20°C abgekühlt. Die Neutronenreflektivitätskurven, die nach dieser Hitzebehandlung erhalten wurden sind in Abbildung 5.3-5 B zu sehen. Durch einfachen Vergleich der beiden Kurven, vor und nach dem Erhitzen, wird klar, dass sich die Struktur der Bürste an der Grenzfläche verändert haben muss. Da die Oszillationen in Abbildung 5.3-5 B dichter sind als in Abbildung 5.3-5 A, muss ein Aufquellen der Bürsten durch die Hitzebehandlung stattgefunden haben.

Streulängendichteprofile der Si / d-PS / PSPAS / Lösung - Grenzfläche bei verschiedenen Temperaturen und Lösungsmittelzusammensetzungen wurden ermittelt, indem wieder ein Schichtmodell an die experimentell erhaltenen Neutronenreflektivitätsdaten mit Hilfe des Parratt-Algorithmus angefitet wurde [66]. Das Schichtmodell besteht *Sandwich*-artig aus einer halbumendlichen Unter- und Oberseite, mit einer kleinen Anzahl von Schichten dazwischen, die die Grenzflächenstruktur beschreiben. Jede Komponente des Modells wird durch eine Streulängendichte  $\rho_i$  beschrieben, die Schichten werden durch eine Dicke  $d_i$  beschrieben, und jede Schichtgrenzfläche wird durch eine Rauigkeit  $\sigma_{i, i+1}$  beschrieben. Durch Variation dieser Parameter lässt sich eine berechnete Neutronenreflektivitätskurve an die gemessenen Daten anfiten. Um das Modell so einfach wie möglich, jedoch physikalisch sinnvoll zu halten, wurde ein Minimum an Schichten verwendet, und bekannte Strukturparameter wurden in der Fitprozedur festgehalten. Die erste Schicht beschreibt den d-PS Film mit einer Dicke von 254 Å, wie sie durch Röntgenstreuungsmessungen bestimmt wurde (siehe Punkt 5.1), und einer Streulängendichte von  $6.2 \times 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$  [39]. Ausgiebige Fitversuche ergaben, dass eine Gesamtdicke von 200 Å notwendig ist, um die Region der PSPAS-Grenzfläche für alle Proben modellieren zu können. Diese Region wurde anschließend in sechs Unterschichten mit einer Dicke von je 33 Å unterteilt. Eine geringere Anzahl an Unterschichten war nicht

ausreichend, um befriedigende Fits zu erhalten, während eine höhere Anzahl zu nicht mehr eindeutigen Streulängendichteprofilen führte. Beim Fitten aller Neutronen-reflektivitätskurven wurden nur die Streulängendichten der Unterschichten variiert. Feste Werte für die Rauigkeiten von 7 Å, für die Si / d-PS Grenzfläche und 8 Å für alle anderen Grenzflächen waren konsistent mit allen Datensätzen.

In Abbildung 5.3-6 sind die Streulängendichteprofile einer Si / d-PS / PSPAS / Lösung-Grenzfläche dargestellt, die durch Fitten, wie es oben beschrieben wurde, erhalten wurden. Die Grenzfläche war dabei in Kontakt mit Pufferlösung ohne Protein. Bei 20°C wurde mit D<sub>2</sub>O-Pufferlösung ein Streulängendichteprofil erhalten, das ein lokales Minimum im Abstand von  $z = 270$  Å von der Si-Oberfläche zeigt und eine lange Schulter bei größeren Distanzen hat (Abb.5.3-6 A). Dieses Profil stimmt mit früheren Messungen völlig überein [46]. Es beschreibt eine relativ hohe Konzentration von PSPAS-Molekülen in der Nähe der d-PS-Schicht und eine kleine Anzahl an PAS-Kettenenden, die weit in die Lösung hineinreichen. Durch Vergleich der D<sub>2</sub>O-Profile mit den entsprechenden HDO-Profilen bei 20°C (Abb. 5.3-6 A), lässt sich sehen, dass das SLD-Profil bei  $z = 270$  Å unabhängig vom Kontrast ist, was auf eine relativ dichte Packung der PSPAS-Moleküle und einen geringen Wasseranteil bei dieser Distanz hinweist.

Bei 40°C wurden stark davon abweichende SLD-Profile erhalten. Das lokale Minimum verschob sich nach  $z = 370$  Å, was höchstwahrscheinlich durch ein starkes Aufquellen der PAS-Bürsten aufgrund der Temperaturerhöhung verursacht worden ist (Abb.5.3-6 B). Offenbar hat ein partielles Loslösen der PSPAS-Moleküle stattgefunden. Die PAS-Kettenenden des Copolymers reichen nun weiter in die Lösung hinein und bilden eine Bürste mit einem höheren Wasseranteil. Es ist anzumerken, dass die relativ hohen Streulängendichten bei Distanzen von  $z = 254 - 370$  Å vermutlich nicht durch eine Verarmung der PAS-Kettenkonzentration in dieser Region zustande gekommen sind, sondern aufgrund von d-PS-Ketten, die aus dem d-PS-Film, in den Bereich der

PAS-Bürste gewandert sind. Dies wird aus dem SLD-Profil deutlich, das nach Abkühlen der Probe von 40 auf 20°C mit HDO-Puffer aus den Reflektivitätskurven ermittelt wurde (Abb. 5.3-6 B).

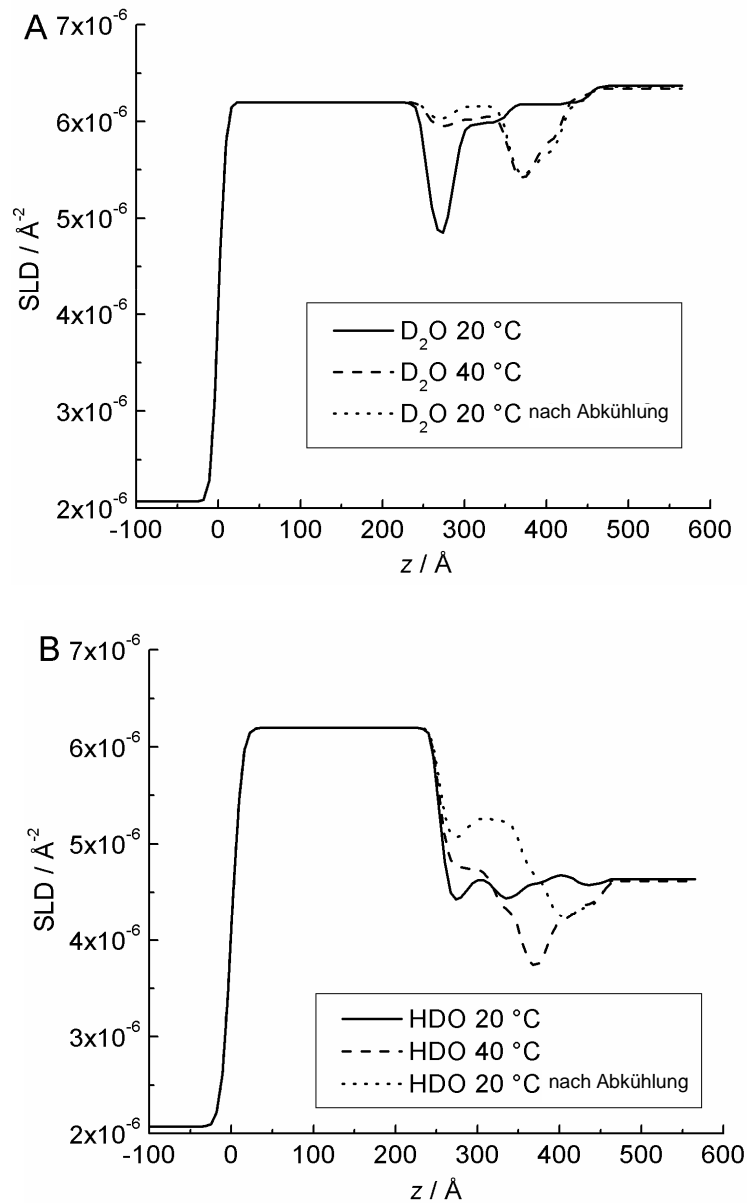


Abb. 5.3-6 Streulängendichteprofile (SLD) einer Si / d-PS / PSPAS / Lösung Grenzfläche als Funktion des Abstandes von der Si-Wafer-Oberfläche. Es sind die Profile zu sehen, die aus den Neutronenreflektivitätskurven erhalten wurden, die mit D<sub>2</sub>O-Puffer (A) und HDO-Puffer (B) gemessen wurden.



Die Streulängendichte bei  $z > 254 \text{ \AA}$  ist dort sogar größer als die des Lösungsmittels, was nur durch perdeuterierte Polymerketten verursacht worden sein kann. Ein Lösen der PSPAS-Ketten vom d-PS-Film kann klar ausgeschlossen werden, da ein Kollaps der PAS-Bürste beobachtet werden kann, sobald Salz zur Pufferlösung zugegeben wird (Abb. 5.3-8). Eine nahe liegende Erklärung für die strukturellen Änderungen der PAS-Bürste infolge der Wärmebehandlung könnte in den Präparationsbedingungen zu finden sein. Während der Präparation wird der Si-Block an der Luft aufgeheizt, um den d-PS-Film mit den PSPAS Molekülen zu verschmelzen. Aufgrund von fehlendem Lösungsmittel ist die PAS-Bürste in einem kollabierten Zustand und die Enden der PAS-Ketten sind innerhalb der Bürste verfangen. Damit sich die PAS-Kettenenden in Wasser besser lösen können, ist offenbar ein Aufwärmen auf  $40^\circ\text{C}$  notwendig, um die Aktivierungsbarriere überwinden zu können, die aufgrund sterischer Hinderung der PAS-Ketten untereinander zustande kommt.

Nach Spülen der Probenzelle bei  $20^\circ\text{C}$  mit einer  $0.05 \text{ mg mL}^{-1}$  BSA-Lösung sind Änderungen in der Neutronenreflektivität der Si / d-PS / PSPAS / Lösung-Grenzfläche gemessen worden (Abb. 5.3-7). Durch Fitten des Schichtenmodells an die gemessenen Reflektivitätskurven, wie es oben beschrieben wurde, sind Streulängendichteprofile erhalten worden, die eine Sicht auf die Verteilung des Proteinadsorbats in z-Richtung ermöglichen. Die Streulängendichteprofile mit BSA liegen über die gesamte Bürstenregion tiefer, als die ohne BSA (Abb. 5.3-7). Der Unterschied zwischen den Streulängendichteprofilen mit und ohne BSA ist dabei proportional zum Volumenbruchprofil von BSA über die gesamte Grenzfläche und ist weitgehend konstant für beide Kontraste. Dieses Ergebnis zeigt eine gleichmäßige Verteilung von BSA innerhalb der Bürste auf. Eine Ansammlung von BSA an den Enden der Bürste, wie man vermuten könnte, findet nicht statt. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den weiter oben beschriebenen Strukturuntersuchungen eines  $\alpha$ -LA-Adsorbats an einer PAS-Bürste.

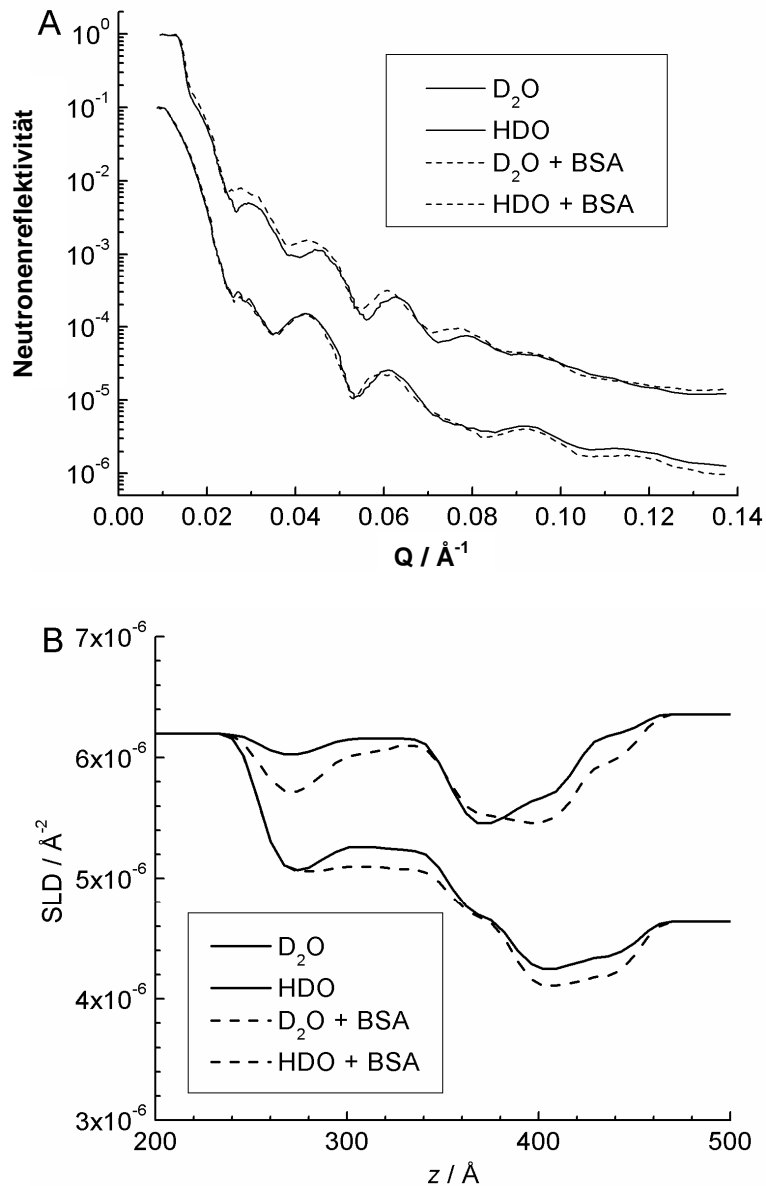


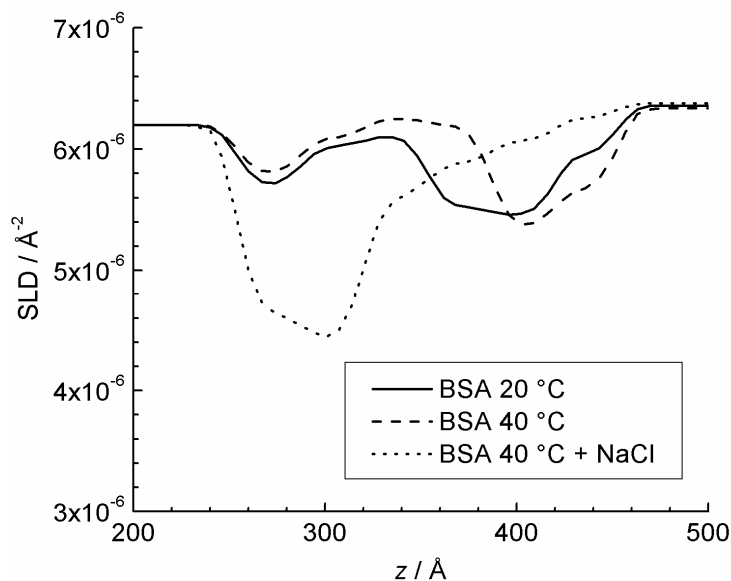
Abb. 5.3-7 Änderungen in der Neutronenreflektivität (A) und der Streulängendichte (B) einer Si / d-PS / PSPAS / Lösung – Grenzfläche aufgrund der Adsorption von BSA an einer PAS-Bürste bei 20°C. Bei A wurden die HDO-Kurven um den Faktor 0.1 verschoben. Bei B beginnen die Streulängendichte-profile bei einer Distanz zur Si-Oberfläche von 200 Å innerhalb des d-PS-Films und enden im Lösungsmittel bei einer Streulängendichte von  $6.37 \cdot 10^{-6} \text{\AA}^{-2}$  mit  $D_2O$  beziehungsweise  $4.64 \times 10^{-6} \text{\AA}^{-2}$  mit HDO als Lösungsmittel.

Aus den Änderungen der Streulängendichteprofile mit und ohne Protein lässt sich, wie es in Abschnitt 5.3.1 behandelt wurde, das Volumenbruchprofil eines Proteins entlang der Grenzfläche berechnen und durch Integration des erhaltenen Volumenbruchprofils nach Gleichung 5.3-5 (S. 63), die Menge an adsorbiertem Protein bestimmen. Die Berechnung ergab für BSA einen Volumenanteil in der PAS-Bürste im Bereich von 7-10%. Zur Bestimmung der Masse wurde von einer molaren Masse von  $M = 66267 \text{ g / Mol}$  und einem molaren Volumen von  $V = 48574 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$  [46] ausgegangen. Mit  $\rho_{\text{BSA}} = 3.19 \cdot 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$  in  $\text{D}_2\text{O}$  und  $2.85 \cdot 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ , ergibt sich eine mittlere Oberflächenkonzentration von  $\Gamma = (1.4 \pm 0.2) \text{ mg m}^{-2}$  aus den beiden Datensätzen, die im Kontrast variiert wurden. Dieser Wert ist vergleichsweise hoch zu dem Wert, der für BSA auf einer planaren Siliziumoberfläche bei  $\text{pH} = 7$  berichtet wird [67], wobei dort die BSA-Konzentration zudem höher als in dieser Studie ist ( $0.15 \text{ mg mL}^{-1}$  BSA, Ionenstärke von  $20 \text{ mM}$ ). Der Unterschied kann teilweise damit erklärt werden, dass die BSA-Moleküle statt auf einer zweidimensionalen Ebene innerhalb einer dreidimensionalen Bürste gepackt werden.

Anschließend wurde die Probenkammer, die BSA in einer Konzentration von  $0.05 \text{ mg mL}^{-1}$  enthielt, von  $20$  auf  $40^\circ\text{C}$  erhitzt, um den Einfluss der Temperatur auf den Adsorptionsgrad zu untersuchen. Aus den erhaltenen Streulängendichteprofilen, konnten jedoch keine klaren Schlussfolgerungen gezogen werden, außer dass es eine Veränderung in der Grenzflächenstruktur aufgrund der Temperaturänderung gegeben haben muss (Abb. 5.3-8). Es wurden deshalb dazu TIRF-Experimente mit vergleichbaren Bedingungen durchgeführt (Abschnitt 5.4.3, S. 94).

Am Ende wurde die Probenzelle bei  $40^\circ\text{C}$  mit einer Konzentration von  $0.05 \text{ mg mL}^{-1}$  BSA und  $500 \text{ mM NaCl}$  gespült. In Abbildung 5.3-9 lässt sich eine starke Änderung in der Neutronenreflektivitätskurve aufgrund des Salzzusatzes zur Probenlösung sehen. Die Oszillationen auf der Kurve, die in Gegenwart von  $\text{NaCl}$  aufgenommen wurden, sind deutlich breiter, was auf eine dünnere Grenzflächen-

struktur hinweist. Dies lässt sich mit einem Kollaps der Bürstenstruktur durch Abschirmen der PAS-Ladungen aufgrund eines reduzierten osmotischen Drucks in der PAS-Bürste erklären. Ein vergleichbarer Effekt wurde auch für sphärische PAS-Bürstenpartikel gefunden [68]. Es ist bekannt, dass eine PAS-Bürste in Gegenwart von Salz mit einer Konzentration von 500 mM bei Raumtemperatur nahezu proteinresistent wird [46, 69, 70, 71, 72]. Dagegen sehen die SLD-Profile bei 40°C und in Gegenwart von NaCl in einer Konzentration von 500 mM danach aus (Abbildung 5.3-8, gestrichelte Linie), dass bedeutende Mengen von BSA unter diesen Bedingungen adsorbiert sind. Das Minimum des SLD-Profiles bei  $z = 300$  Å liegt tiefer und ist breiter als das Minimum das in Abwesenheit von Protein gefunden wurde (Abbildung 5.3-6). Es sieht danach aus, als ob der Zusatz von Salz bei 40°C die Adsorption von BSA auf einer planaren PAS-Bürste sogar fördert. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden zum Vergleich TIRF-Experimente bei identischen Bedingungen durchgeführt (Abschnitt 5.4.3, S.92).



*Abb. 5.3-8* Streulängendichteprofile einer Si / d-PS / PSPAS / Lösung – Grenzfläche in der Region der PAS-Bürste. Die Lösung war mit D<sub>2</sub>O als Lösungsmittel auf eine BSA-Konzentration von 0.05 mg mL<sup>-1</sup> eingestellt. Die Probenzelle wurde von 20 auf 40°C erhitzt und danach auf eine NaCl-Konzentration von 500 mM eingestellt, wie in der Legende aufgeführt wird.

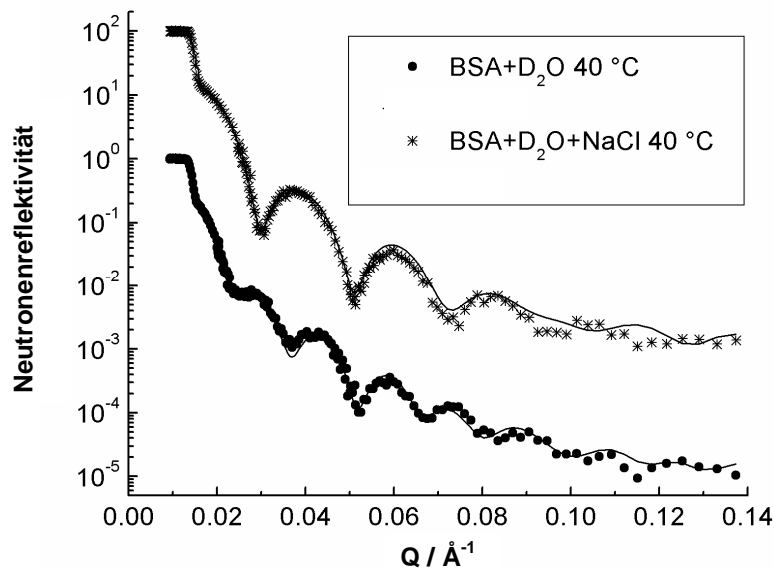


Abb. 5.3-9 Neutronenreflektivitätskurven, die den Effekt von NaCl (500 mM) auf die Struktur einer Si / d-PS / PSPAS / Lösung – Grenzfläche zeigen. Zusatz von Salz führt zu einer starken Verbreiterung der Oszillationen und Verschärfen der Minima, was mit einem Kollaps der PAS-Bürste zu erklären ist. Zur Übersichtlichkeit wurde die Kurve, die mit NaCl aufgenommen wurde, um den Faktor 100 im Diagramm nach oben verschoben.

### 5.3.3 Experimente zur Adsorption von Insulin an einer PAH / PSS-Multischicht [102]

In einer ergänzenden Studie wurde die Adsorption von Insulin an einer hydrophoben dPS, einer positiv geladenen PAH und einer negativ geladenen PSS-Oberfläche untersucht. Motivation war dabei, dass gegenwärtig nur wenig über die relativen Anteile der elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungskräfte bei der Bindung von Insulin an negativ geladene Lipidmembranen bekannt ist. Werden Lipidmembranen als Bindungssubstrat verwendet ist eine klare Aufteilung der beiden Wechselwirkungsarten nahezu unmöglich. Aus diesem Grund wurde die spontane Adsorption von Insulin an Modelloberflächen untersucht, indem eine Siliziumoberfläche mit verschiedenen Polymerfilmen

präpariert wurde. Ein hydrophober Polystyrolfilm sollte dazu dienen die Bedeutung der hydrophoben Wechselwirkung als Triebkraft für die Insulinadsorption zu untersuchen, während positiv und negativ geladene Polyelektrolytschichten die elektrostatisch geladenen Lipidkopfgruppen imitieren sollten.

In Abbildung 5.3-10 sind ausgewählte Reflektivitätskurven zu sehen. Im Fall der hydrophoben dPS-Oberfläche, wurde zuerst eine Reflektivitätskurve mit einer Mischung aus D<sub>2</sub>O und H<sub>2</sub>O im Verhältnis von 3:1 in Abwesenheit von Insulin verwendet (in Abbildung 5.3-10 als HDO gekennzeichnet). Dieses Lösemittel hat eine signifikant kleinere Streulängendichte als der dPS-Film, so dass die Filmdicke und Rauigkeit sehr genau bestimmt werden kann. Unter Anwendung eines Einschichtmodells Si / dPS / HDO wurde die berechnete Reflektivitätskurve durch Variation der Dicke und Rauigkeit der dPS-Schicht an die experimentell erhaltene angeglichen (Abb.5.3-10).

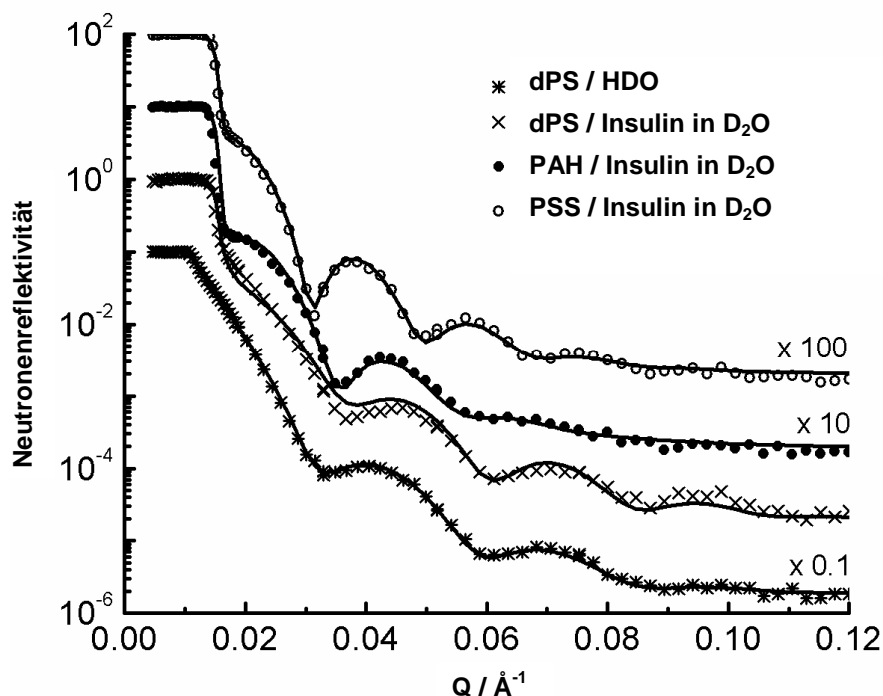


Abbildung 5.3-10 Neutronenreflektivitätskurven einer Silizium-Polymer-Lösung – Grenzfläche mit und ohne adsorbiertem Insulin (pD = 7.4, 20°C, eine Stunde Inkubation). Die Symbole zeigen die experimentellen Daten, durchgezogene Linien die Fits. Zur Übersichtlichkeit wurden die Kurven verschoben.

Das erhaltene Streulängendichteprofil zeigt eine dPS-Filmdicke von 219 Å und eine Rauigkeit der dPS-Lösung – Grenzfläche von 18 Å an (Abb. 5.3-11, Tabelle 5.3-1). Dann wurde die Probenzelle mit Insulinlösung in D<sub>2</sub>O (pD = 7.4) befüllt. In diesem Fall bildet sich ein Insulinadsorbat auf der dPS-Oberfläche. Die zugehörige Neutronenreflektivitätskurve wurde deshalb mit einem Zweischichtenmodell Si / dPS / Insulinadsorbat / Lösung ausgewertet (Abbildung 5.3-10, Tabelle 5.3-1). Das zugehörige Streulängendichteprofil ist in Abbildung 5.3-11 zu sehen. Angemerkt werden sollte, dass die dPS-Filmdicke scheinbar kleiner ist in Anwesenheit des Insulinadsorbates (213 Å, Tabelle 5.3-1). Dies lässt sich mit der relativ großen Rauigkeit der dPS-Film Oberfläche erklären. Insulin wird bei Adsorption teilweise in die dPS-Schicht eingedrungen sein (Abbildung 5.3-11). Daher kann die beobachtete Dicke von 213 Å nicht mehr als der wahre Wert betrachtet werden, sondern lediglich als Abstand der Si-Oberfläche zum Insulinadsorbat. Aus dem Streulängendichteprofil (Abb.5.3-11) der d-PS-Oberfläche, die in Kontakt mit der Insulinlösung bei pD = 7.4 ist, kann eine Dicke von  $d = 55 \text{ Å}$  und eine Streulängendichte von  $\rho_{\text{ads}} = 5.67 \times 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$  für das Insulinadsorbat bestimmt werden. Die berechnete Streulängendichte von Insulin in D<sub>2</sub>O liegt bei  $\rho_{\text{Protein}} = 3.27 \times 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$ . Dabei wurde die Primärsequenz [73] verwendet, die Neutronenstreulängen die vom amerikanischen *National Institute of Standards and Technology* (NIST) [62] veröffentlicht werden, und ein spezifisches Volumen von  $v = 0.717 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  [74]. Mit  $\rho_{\text{Lösung}} = 6.4 \times 10^{-6} \text{ Å}^{-2}$  lässt sich der Volumenanteil von Insulin im Adsorbat an dem dPS-Film zu  $\phi_{\text{Protein}} = 0.23$  bestimmen (Vorgehensweise siehe Abschnitt 5.3.1). Daraus lässt sich nach Gleichung 5.3-5 (S. 63) eine adsorbierte Masse von  $1.7 \text{ mg m}^{-2}$  auf der dPS-Oberfläche berechnen. Allerdings sollte dabei beachtet werden, dass der Fit, der für die Reflektivitätskurve von adsorbiertem Insulin an einer dPS-Oberfläche berechnet wurde, kleine systematische Abweichungen zeigt (Abbildung 5.3-10), was ein Hinweis auf laterale Inhomogenitäten innerhalb des Insulinadsorbates ist.

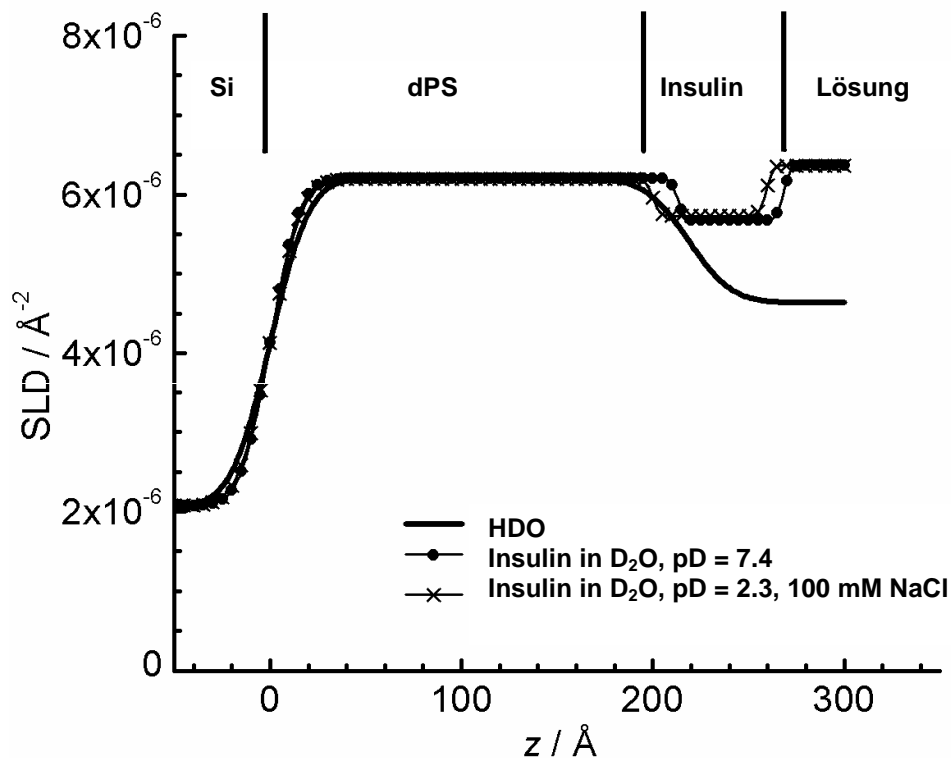


Abb. 5.3-11 Streulängendichteprofile einer Silizium-dPS-Lösung-Grenzfläche, ohne und mit adsorbiertem Insulin (20°C), wie sie aus den Neutronenreflektivitätskurven erhalten wurden. Die dicke Linie wurde in Abwesenheit von Insulin in einer Mischung aus  $\text{D}_2\text{O}$  und  $\text{H}_2\text{O}$  im Verhältnis 3:1 (als HDO gekennzeichnet) erhalten. Die dünnen, durchgezogenen Linien mit Symbolen entsprechen der Grenzflächenstruktur in Anwesenheit von Insulin in  $\text{D}_2\text{O}$ .

In einem Neutronenstreuexperiment, wird die Grenzflächenstruktur auf einer Längenskala von Mikrometern lateral gemittelt [39], während in diesem Experiment die gesamte Oberfläche über die gemessen wurde im Bereich von  $20 \text{ cm}^2$  liegt. Sollte die Grenzflächenrauigkeit eine größere Welligkeit besitzen, als der Bereich über den lateral gemittelt wird, also größer als einige Mikrometern, wird die gemessene Reflektivität eine Superposition aus leicht unterschiedlichen Reflektivitäten sein, die von ähnlichen Grenzflächenstrukturen stammen. Aus



diesem Grund lassen sich die erhaltenen Daten nur begrenzt durch ein einfaches Schichtmodell beschreiben.

*Tabelle 5.3-1* Fitparameter und adsorbierte Mengen von Insulin an unterschiedlichen Polymeroberflächen und unter verschiedenen Bedingungen<sup>a</sup>.

	T / °C	pD	c <sub>NaCl</sub> / mM	$\rho_{\text{pol}} /$ $10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$	$d_{\text{pol}} /$ $\text{\AA}$	$\sigma_{\text{pol}} /$ $\text{\AA}$	$\rho_{\text{ads}} /$ $10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$	$d_{\text{ads}} /$ $\text{\AA}$	$\sigma_{\text{ads}} /$ $\text{\AA}$	$\Gamma / \text{mg}$ $\text{m}^{-2}$
dPS				6.2	219	18				
dPS / Insulin	20	7.4	0	6.2	213	3	5.7	55	3	1.7
dPS / Insulin	20	2.3	100	6.2	200	3	5.7	59	3	1.7
dPS / Insulin	60	2.3	100	6.2	200	3	5.7	62	3	1.8
PAH <sup>b</sup>				4.5	263	8				
PAH / Insulin	20	7.4	0	4.5	263	5	4.8	19	5	1.3
PAH / Insulin	20	7.4	100	4.5	263	5	5.0	16	5	1.0
PSS <sup>c</sup>				4.3	296	9				
PSS / Insulin	20	7.4	0	4.3	296	5	4.5	30	5	2.5
PSS / Insulin	20	7.4	100	4.3	296	5	4.5	34	5	2.9
PSS / Insulin	60	7.4	100	4.3	296	5	4.9	23	5	1.6

<sup>a</sup> Die Insulin Konzentration war  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $17 \text{ }\mu\text{M}$ ).  $\rho_{\text{pol}}$ ,  $d_{\text{pol}}$ ,  $\sigma_{\text{pol}}$ ,  $\rho_{\text{ads}}$ ,  $d_{\text{ads}}$ ,  $\sigma_{\text{ads}}$  sind die Streulängendichten, Dicken und Rauigkeiten der Polymere beziehungsweise adsorbierten Proteinschichten. Der experimentelle Fehler in der adsorbierten Masse wird auf  $\pm 0.2 \text{ mg m}^{-2}$  geschätzt.

<sup>b</sup> Polyelektromultischicht, die mit PAH endet.

<sup>c</sup> Polyelektromultischicht, die mit PSS endet.

Zusätzlich wurde nach Austausch der Probenlösung gegen eine Insulinlösung mit D<sub>2</sub>O als Lösungsmittel, einem pD von 2.3 und einer NaCl-Konzentration von 100 mM eine Reflektivitätskurve aufgenommen (Daten sind nicht gezeigt). Ein Senken des pD-Wertes der Lösung von 7.4 auf 2.3 führt zur Dissoziation der Insulinoligomere, die bei pD = 7.4 vorliegen, und führt bei pD = 2.3 zur Bildung von Insulindimeren [75, 76]. Als Folge der Dissoziation kann Insulin bei pD 2.3, tiefer in die raue dPS-Oberfläche eindringen als bei pD 7.4, was sich deutlich in den Streulängendichteprofilen zeigt (Abbildung 5.3-11). Eine Änderung in der

Gesamtmasse nach Erniedrigung des pD-Wertes ist allerdings nicht zu sehen. Am Ende wurde die Probenzelle auf 60°C erhitzt (bei dieser Temperatur ist bekannt, dass Insulin in Lösung aggregiert), was jedoch zu keiner signifikanten Änderung in der Grenzflächenstruktur führte (Tabelle 5.3-1).

Mit den Polyelektrolytmultischichtstrukturen Si-PEI-PSS-(PAH-PSS)<sub>4</sub>-PAH and Si-PEI-PSS-(PAH-PSS)<sub>5</sub> wurde die Insulinadsorption auf elektrostatische Triebkräfte hin untersucht. Diese Strukturen enden mit positiv geladenen PAH- beziehungsweise negativ geladenen PSS-Ketten. Da die Polyelektrolyte, die verwendet wurden, nicht deuteriert waren, sind die Strukturparameter wie Dicke, Streulängendichte sowie Rauigkeit aus den Neutronenreflektivitätsdaten bestimmt worden, die in D<sub>2</sub>O-Puffer erhalten wurden, da dieser einen starken Kontrast zu den Schichten bildet. Die Neutronenreflektivitätskurven wurde auf der Basis eines Einschichtmodells Si / Multischicht / Lösung (Tabelle 5.3-1) angefitet. Die daraus erhaltenen Streulängendichteprofile sind in Abbildung 5.3-12 zu sehen.

Anschließend wurde die Probenzelle mit Insulinlösung befüllt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden Reflektivitätskurven aufgenommen wie sie in Abbildung 5.3-12 zu sehen sind. Auf der Grundlage eines Zweischichtmodells, Si / Multischicht / Insulinadsorbat / Insulinlösung (Tabelle 5.3-1) wurden die Daten ausgewertet. Die daraus erhaltenen Streulängendichteprofile sind ebenfalls in Abbildung 5.3-12 dargestellt.

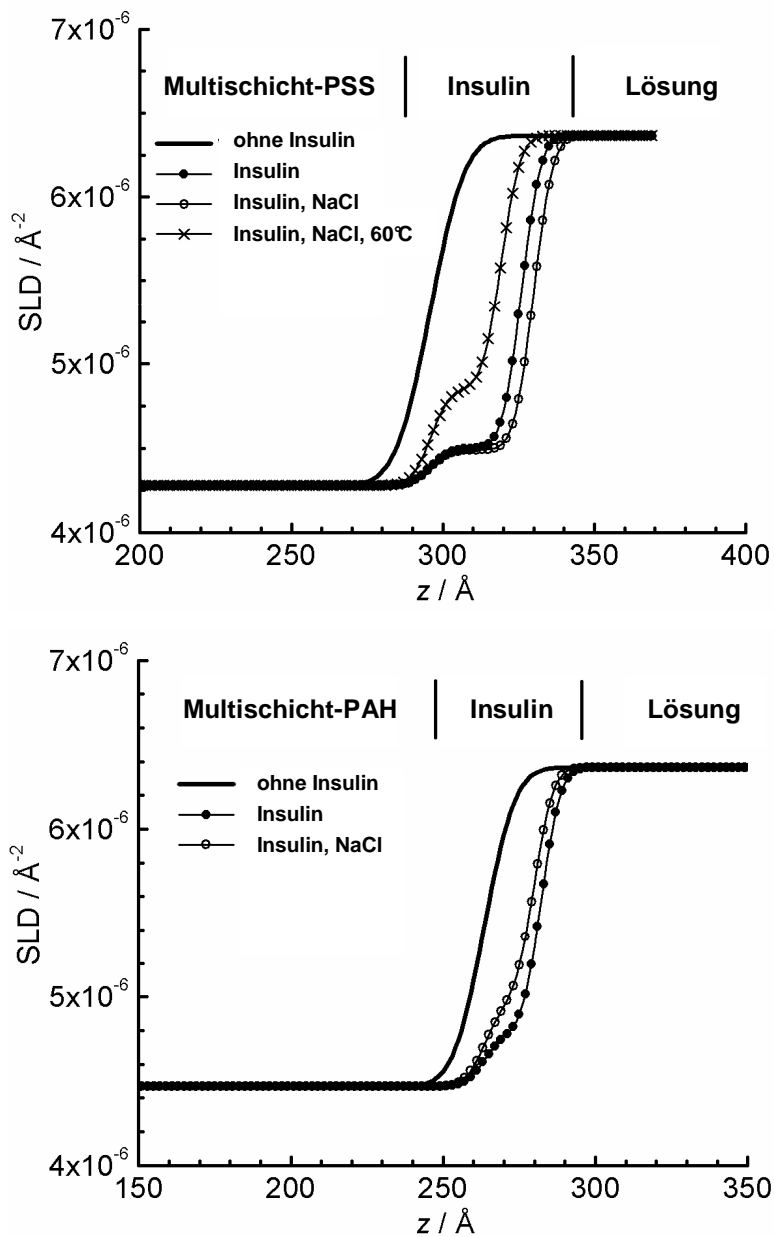


Abb. 5.3-12 Streulängendichteprofile einer Silizium-Polyelektrolytmultischicht-Lösung Grenzfläche. Die dicke Linie zeigt die Grenzflächenstruktur in Abwesenheit von Insulin. Die dünnen, durchgezogenen Linien mit Symbolen entsprechen den Grenzflächenstrukturen in Anwesenheit von Insulin, wenn Insulinadsorbate die auf einer Multischicht gebildet werden (20°C, pD = 7.4). Die Silizium Oberfläche befindet sich bei  $z = 0$  Å.

Wie sich in Abb. 5.3-12 deutlich sehen lässt, bildet sich auf einer PSS-Oberfläche ein offensichtlich dickeres Adsorbat als auf einer PAH-Oberfläche. Wird eine  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $17 \text{ }\mu\text{M}$ ) Insulinlösung verwendet ( $\text{pD} = 7.4$ ,  $20^\circ\text{C}$ ), erhält man auf PAH ein  $19 \text{ }\text{\AA}$  dickes Insulinadsorbat mit einem Volumenanteil von 0.51, während auf PSS das Adsorbat eine Dicke von  $30 \text{ }\text{\AA}$  besitzt und einen Volumenanteil von 0.60 hat. Mit diesen Strukturparametern lässt sich eine Menge von  $1.3 \text{ mg m}^{-2}$  auf PAH und  $2.5 \text{ mg m}^{-2}$  auf PSS berechnen. Das Insulin, das bei  $\text{pD} = 7.4$  eine negative Nettoladung trägt, weist an der negativ geladenen PSS-Oberfläche einen signifikant höheren Adsorptionsgrad auf als an der positiv geladenen PAH-Oberfläche, was zunächst unerwartet ist. Dennoch ist dieser Befund konsistent mit einer Insulinaggregationsstudie, die an Lipidmembranen durchgeführt wurde [77]. Dort ist nach Zugabe von negativ geladenen Lipidmolekülen zu einer Lipidmembran ein Anstieg in der Formation von Amyloidfibrillen aus Insulin beobachtet worden. Es ist möglich, dass die negativ geladenen Lipide Insulinmoleküle an der Membranoberfläche ansammeln und so die Keimformation stark erleichtert wird. Bis jetzt kann keine eindeutige Erklärung für die bevorzugte Adsorption von Insulin bei  $\text{pD} = 7.4$  auf einer negativ geladenen PSS-Oberfläche, im Vergleich zu einer positiv geladenen PAH-Oberfläche, gegeben werden. Allgemein lässt sich sagen, dass in der Nähe des isoelektrischen Punktes von Insulin bei  $\text{pH} = 5.3$  [36] die Nettoladung von Insulin eine eher untergeordnete Rolle bei der Wechselwirkung mit einer geladenen Oberfläche spielen sollte. Dagegen könnte die Verteilung der positiven und negativen Ladungen auf der Proteinoberfläche von großer Bedeutung sein. Zudem könnte man vermuten, dass die negativen Ladungen von Insulin, die von den Glutaminsäureresten stammen, schlecht zugänglich sind und damit kaum in Wechselwirkung mit einer Oberfläche treten können. Zusätzlich hat Insulin bei  $\text{pH} = 7$  eine Tendenz zur Selbstassoziation [78, 79], was die Anzahl an zugänglichen Proteinoberflächenladungen wahrscheinlich verringert.

In Gegenwart von NaCl in einer Konzentration von  $100 \text{ mM}$  spiegelt jedoch der Adsorptionsgrad von Insulin an einer Multischicht die Nettoladung der Insulinmoleküle bei  $\text{pD} = 7.4$  wieder. Auf einer PAH-Oberfläche schirmt der

Salzzusatz die elektrostatische Anziehung zwischen dem Protein und der Grenzfläche ab, was zu einem dünnerem Adsorbat (Abb. 5.3-12) und einem Verlust an adsorbiertem Insulin von 1.3 auf 1.0 mg m<sup>-2</sup> führt. Gleichmaßen wächst nach Salzzusatz das Insulinadsorbat auf einer PSS-Oberfläche (Abb. 5.3-12) aufgrund der Abschirmung von elektrostatischer Abstoßung. Gleichzeitig erhöht sich die adsorbierte Masse von Insulin von 2.5 auf 2.9 mg m<sup>-2</sup>.

Ein interessantes Resultat wurde erreicht, als zum Abschluss die Probe mit Insulin an einer PSS-Oberfläche von 20 auf 60°C erwärmt wurde. Wie in dem entsprechenden Streulängenprofil in Abbildung 5.3-12 gesehen werden kann, desorbiert Insulin teilweise durch diese Wärmebehandlung. Etwa 1.6 mg m<sup>-2</sup> verbleiben bei 60°C im adsorbierten Zustand. Dieses Verhalten weist auf eine exotherme Triebkraft der Proteinadsorption von Insulin an einer PSS-Oberfläche hin. Die Triebkraft könnte dabei die elektrostatische Wechselwirkung von lokalen positiven Ladungen auf der Proteinoberfläche von Insulin und den negativen Ladungen von PSS sein.

Als die Probe mit PAH als abschließende Schicht verwendet wurde, war es leider mehrfach nicht möglich, die Probe auf 60°C zu erhitzen, ohne dass sich dabei die Multischicht Si-PEI-PSS-(PAH-PSS)<sub>4</sub>-PAH (mit einer ungerade Anzahl an Schichten) ablöste. Diese Beobachtung ist konsistent mit einem gerade-ungerade-Effekt, der in der Literatur für Polyelektrolytmultischichten berichtet wird. Beim Aufbau einer PAH-PSS-Multischicht ändert sich der Lösemittelanteil abwechselnd mit jeder zusätzlichen Schicht [80]. Außerdem brechen Multischichtkapseln, die mit einer ungeraden Anzahl von Polydiallyldimethylammoniumchlorid-PSS - Schichten aufgebaut worden sind, bei 60°C auf, wohingegen Multischichtkapseln, die mit einer geraden Anzahl an Schichten aufgebaut wurden, bis zu 90°C stabil sind [81].

## 5.4 TIRF-Spektroskopie

### 5.4.1 TIRF-Spektroskopie-Experimente zur Dynamik von adsorbiertem $\alpha$ -LA an Polyacrylsäure-Bürsten [101]

TIRF-Spektroskopie wurde angewandt, um das Protein  $\alpha$ -LA innerhalb der PAS-Bürste untersuchen zu können, dagegen wurden Messungen in Lösung, mit Hilfe der konventionellen Fluoreszenz-Spektroskopie durchgeführt, bei denen Rechteckküvetten zum Einsatz kamen. In Abbildung 5.4-1, ist die Gesamtfluoreszenzintensität von  $\alpha$ -LA, markiert mit Alexa Fluorophor 488, als Funktion der Temperatur dargestellt. Obwohl ein extrinsischer Fluorophor verwendet wurde, scheinen die erhaltenen Daten die thermische Entfaltung des Proteins zu zeigen, da die beiden Kurven eine sigmoidale Temperaturabhängigkeit aufweisen (Abb. 5.4-1). Werden die Entfaltungstemperaturen im gelösten und adsorbierten Zustand des Proteins am Wendepunkt entnommen, ergibt sich eine Entfaltungstemperatur von  $\alpha$ -LA von etwa 55°C in Lösung und 45°C innerhalb der PAS-Bürste. Zudem deuten die Daten in Abbildung 5.4-1 darauf hin, dass die Konformationen von  $\alpha$ -LA bei 20 und 40°C (den Temperaturen, die bei den NR-Experimenten in Abschnitt 5.3.1 verwendet wurden), ähnlich sind.

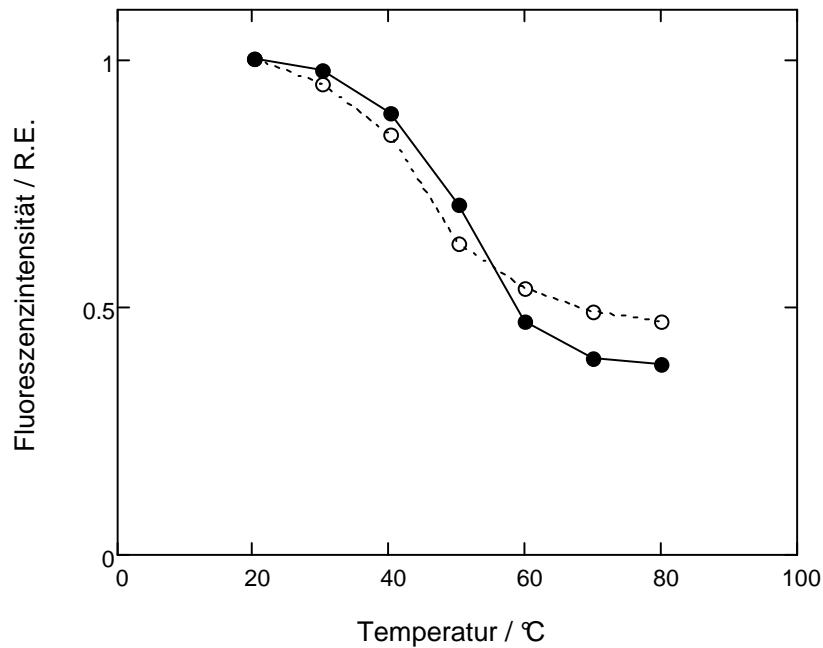


Abb. 5.4-1 Gesamtfluoreszenzintensität von  $\alpha$ -LA markiert mit Alexa Fluor 488 Farbstoff, in Lösung (durchgezogene Linie) und adsorbiert auf einer PAS-Bürste (gestrichelte Linie). Im letzteren Fall wurde TIRF-Spektroskopie angewandt. Die Symbole stellen Durchschnittswerte aus zwei Messungen in Lösung und vier TIRF Messungen dar. Der experimentelle Fehler liegt bei  $\pm 0.02$  beziehungsweise  $\pm 0.07$ .

Die statische Fluoreszenzanisotropie,  $r$ , ergibt sich aus der zeitabhängigen Fluoreszenzanisotropie,  $r(t)$ , gewichtet mit der zeitabhängigen Fluoreszenzintensität,  $I(t)$  [82]:

$$r = \frac{\int_0^t I(t)r(t)dt}{\int_0^t I(t)dt} \quad (5.4-1)$$

$r(t)$  klingt exponentiell aufgrund der Rotationsdynamik des Fluorophors während der Fluoreszenzlebensdauer ab. Im Fall monoexponentieller Abklingkurven von  $r(t)$  und  $I(t)$  ist die statische Fluoreszenzanisotropie gegeben durch:

$$r = r_0 \frac{\theta}{\tau + \theta} \quad (5.4-2)$$

hierbei ist  $r_0$  die maximale Fluoreszenzanisotropie bei  $t=0$ ,  $\theta$  die Rotationskorrelationszeit und  $\tau$  die Fluoreszenzlebenszeit. Demnach geht  $r$  gegen Null für schnelle Rotationen des Fluorophors ( $\theta \rightarrow 0$ ), während  $r = r_0$  für langsame Rotationen ( $\theta \rightarrow \infty$ ) ist. Wenn ein Protein einen sehr mobilen, extrinsischen Fluorophor trägt, wird die Rotationskorrelationszeit,  $\theta$ , und die Fluoreszenzanisotropie,  $r$ , von der Rotationsdynamik des gesamten Proteins dominiert [36].

In Abbildung 5.4-2 ist die Fluoreszenzanisotropie von  $\alpha$ -LA, markiert mit dem Fluorophor Alexa 488, als Funktion der Temperatur aufgetragen. Wie sich im Diagramm sehen lässt, sinkt die statische Fluoreszenzanisotropie von in Lösung befindlichem  $\alpha$ -LA mit steigender Temperatur, bis die Entfaltungstemperatur von 55°C erreicht ist (Abb.5.4-2 durchgezogene Linie). Diese Beobachtung entspricht dem Verhalten, das durch eine erhöhte Rotationsdiffusionszeit bei höheren Temperaturen zu erwarten ist. Die Rotationskorrelationszeit ist abhängig von der Mikroviskosität des umgebenden Mediums,  $\eta$ , dem Volumen des rotierenden Teilchens,  $V$ , und der thermischen Energie,  $kT$  [83]:

$$\theta = \frac{\eta V}{kT} \quad (5.4-3)$$

Demgemäß ist ein Anstieg in der Temperatur,  $T$ , und einer begleitenden Verringerung der Mikroviskosität,  $\eta$ , mit einer Verkleinerung von  $\theta$  verbunden. Wenn das Protein oberhalb von 55°C entfaltet, vergrößert sich sein Stokes-



Radius, was zur Folge hat, dass sich seine Rotationsdynamik verlangsamt. Folglich steigt  $r$  etwas.

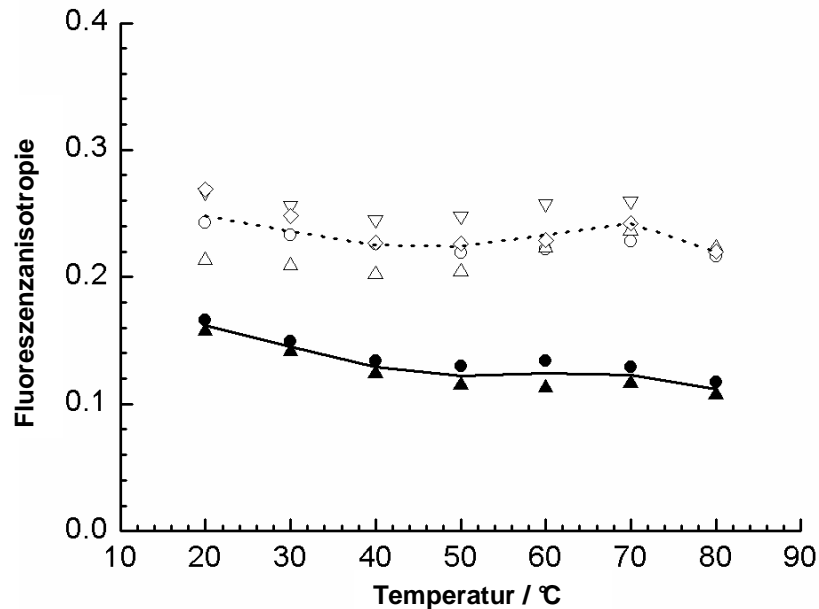


Abb.5.4-2 Fluoreszenzanisotropie von  $\alpha$ -LA, markiert mit Alexa Fluorophor 488, in Lösung (durchgezogene Linie) und adsorbiert an einer PAS-Bürste (gestrichelte Linie). Die Symbole entsprechen unterschiedlichen Messungen, während die Linien die Durchschnittswerte darstellen.

Bemerkenswert ist, dass die statische Fluoreszenzanisotropie,  $r$ , von  $\alpha$ -LA, das an einer PAS-Bürste adsorbiert ist, ebenfalls mit der Temperatur kleiner wird, bis die Entfaltungstemperatur von 45°C erreicht ist (Abb. 5.4-2, gepunktete Linie). Folglich findet in der PAS-Bürste wie in Lösung bei 20°C Rotationsdiffusion der Proteine statt, die sich durch Temperaturerhöhung beschleunigen lässt. Offenbar ist die Wechselwirkung zwischen einem Protein und einer PAS-Bürste stark genug, um das Molekül adsorbieren zu lassen, jedoch gleichzeitig schwach genug, um die Rotationsdynamik des Proteinmoleküls weitgehend zu erhalten.

Um die Rotationskorrelationszeit,  $\theta$ , aus der statischen Fluoreszenzanisotropie zu bestimmen, muss die Fluoreszenzlebenszeit,  $\tau$ , bekannt sein (Gleichung 5.4-2). Aus diesem Grund wurden die Fluoreszenzlebenszeiten von  $\alpha$ -LA in Lösung

und im adsorbierten Zustand gemessen. Wie im experimentellen Teil der Arbeit beschrieben, wurden die Experimente in der Frequenzdomäne durchgeführt. In Abbildung 5.4.3 sind typische Fluoreszenzlebenszeitdaten zu sehen. Auf der Basis einer biexponentiellen Abklingfunktion der Fluoreszenzintensität konnten die Daten nach Gleichung 5.4-4 ausgewertet werden:

$$I(t) = \frac{f_1}{\tau_1} \exp(-t/\tau_1) + \frac{f_2}{\tau_2} \exp(-t/\tau_2) \quad (5.4-4)$$

Hierbei sind  $f_1$  und  $f_2$  die Anteile in der Intensität ( $f_1 + f_2 = 1$ ),  $\tau_1$  und  $\tau_2$  sind die Fluoreszenzlebenszeiten. Wird diese Gleichung in Gleichung 5.4-1 eingesetzt, ergibt sich für die statische Anisotropie:

$$r = r_0 \left( f_1 \frac{\theta}{\tau_1 + \theta} + f_2 \frac{\theta}{\tau_2 + \theta} \right) \quad (5.4-5)$$

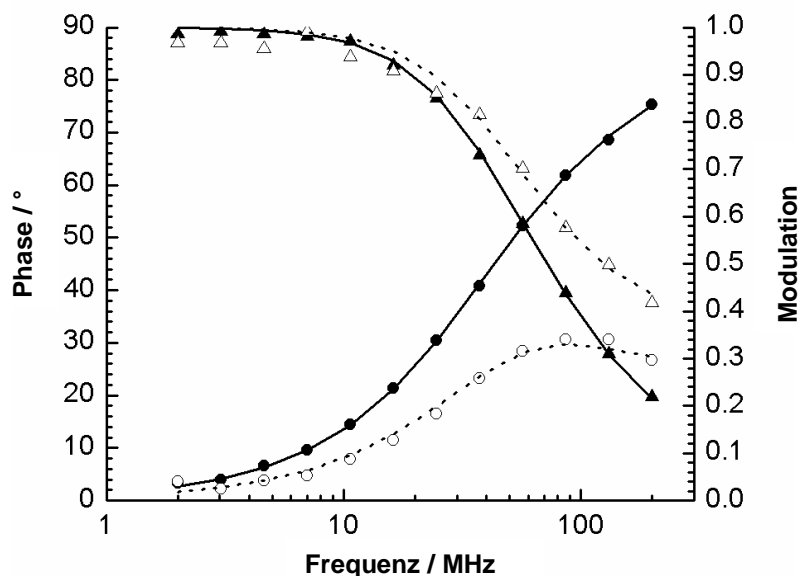


Abb. 5.4-3 Typische Fluoreszenzlebenszeitmessung von  $\alpha$ -LA, markiert mit Alexa Fluor 488 Farbstoff in Lösung (ausgefüllte Symbole) und adsorbiert an einer PAS-Bürste (offene Symbole). Kugeln und Dreiecke entsprechen den Daten für die Phase beziehungsweise der Modulation. Die durchgezogenen und gestrichelten Linien entsprechen den Fits, die auf Basis einer biexponentiellen Abklingkurve berechnet wurden.

Die Fluoreszenzlebenszeitmessungen wurden drei Mal für  $\alpha$ -LA in Lösung und vier Mal für adsorbiertes  $\alpha$ -LA durchgeführt. Die Fitresultate sind in Tabelle 5.4-1 zusammengefasst:

*Tabelle 5.4-1* Fluoreszenzlebenszeiten von  $\alpha$ -LA in Lösung und adsorbiert an einer PAS-Bürste bei 20°C. <sup>a</sup>

	$f_1$	$\tau_1 / \text{ns}^b$	$f_2$	$\tau_2 / \text{ns}$
<b>gelöst</b>	0.86	3.97	0.14	0.49
	0.95	3.97	0.05	1.04
	0.94	3.97	0.06	1.01
<b>adsorbiert</b>	0.63	3.57	0.37	0.30
	0.63	3.57	0.37	0.15
	0.70	3.57	0.30	0.50
	0.79	3.57	0.21	0.36

<sup>a</sup> Das Protein wurde mit Alexa Fluor 488 Farbstoff markiert. Es wurden globale Fitanalysen der drei Messungen im gelösten Zustand und der vier Messungen im adsorbierten Zustand durchgeführt. <sup>b</sup> Dieser Parameter wurde in einer globalen Fitanalyse verlinkt.

Mit  $f_1$ ,  $f_2$ , den Lebenszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  aus den Fluoreszenzlebenszeitmessungen und der statischen Anisotropie  $r$  aus den Fluoreszenzanisotropiemessungen wurde die Rotationskorrelationszeit,  $\theta$ , nach Gleichung (5.4-5) berechnet. Dazu wurde  $r_0$  auf den Wert 0.267 gesetzt. Dieser Wert wurde erhalten, indem die Daten der Messungen in Lösung aus Abbildung 5.4-1 in der Form  $1 / r$  gegen  $T / \eta$  (Perrin-Plot, nicht dargestellt) aufgetragen wurden [36]. Der extrapolierte Wert von  $T / \eta = 0$  entspricht dabei  $1 / r_0$ . Für in Lösung bei 20°C befindliches  $\alpha$ -LA wurde eine Rotationskorrelationszeit von  $(5.5 \pm 0.5)$  ns gefunden. Dabei wurde eine durchschnittliche statische Anisotropie von 0.162 (Abb. 5.4-1) verwendet. Nach Adsorption an einer PAS-Bürste bei 20°C wurde eine größere Rotationskorrelationszeit von  $(32 \pm 5)$  ns aus einer statischen Anisotropie von 0.248 (Abb. 5.4-1) bestimmt. (Die angegebenen Fehler in der Rotationskorrelationszeit ergeben sich aus den Fehlern in den Fluoreszenzlebenszeit-

messungen.) Demnach ist die Rotationsbeweglichkeit von  $\alpha$ -LA nach Adsorption auf einer PAS-Bürste etwa um den Faktor 6 verlangsamt. Bemerkenswert ist, dass die gefundene Rotationskorrelationszeit von  $\alpha$ -LA in Lösung in guter Übereinstimmung mit Gleichung 5.4-3 ist. Wenn man von einer Hydratation von 0.2 g Wasser pro Gramm Protein ausgeht [36], ergibt sich ein Volumen des rotierenden Moleküls von  $V = 2.2 \cdot 10^{-26} \text{ m}^3$ . Mit  $\eta = 1.00 \cdot 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und  $T = 293 \text{ K}$ , ergibt sich eine berechnete Rotationskorrelationszeit von  $\theta = 5.4 \text{ ns}$ .

Man könnte versuchen, die Änderung in der Rotationskorrelationszeit,  $\theta$ , mit einer Änderung in der Viskosität  $\eta$  des Lösungsmittels zu erklären. Innerhalb einer PAS-Bürste ist die Ionenstärke erhöht, die sich auf einen Wert von etwa 250 mM abschätzen lässt [69]. Während reines Wasser bei 20°C eine Viskosität von  $1.00 \cdot 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$  besitzt, hat eine wässrige, 250 millimolare Lösung von NaCl eine Viskosität von  $1.02 \cdot 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , was die beobachtete Änderung in der Rotationskorrelationszeit von  $\alpha$ -LA nach Adsorption auf einer PAS-Bürste, offensichtlich nicht verursachen kann. Dennoch ist die Viskosität innerhalb einer PAS-Bürste aufgrund der Polymerketten signifikant höher. Mit einer Bürstendichte von  $0.2 \text{ nm}^{-2}$ , einer Kettenlänge von 222 Monomeren und einer Bürstendicke von 200 Å (siehe Abb. 5.3-4, S. 63), ergibt sich eine durchschnittliche Konzentration von  $265 \text{ g L}^{-1}$ . Dies entspricht einer Viskosität von  $6 \cdot 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (die Grenzviskositätszahl,  $[\eta]$ , einer PAS-Lösung mit einer molaren Masse von PAS von  $15\,000 \text{ g mol}^{-1}$ , einer Neutralisation von 50% und einer NaCl-Konzentration von 100 mM wird mit  $0.019 \text{ L g}^{-1}$  berichtet [84]). Selbstverständlich ist dieser Wert nur eine Abschätzung für die durchschnittliche Verteilung innerhalb einer PAS-Bürste und kann sich von der Mikroviskosität, die durch die rotierenden Proteinmoleküle erfasst wird, unterscheiden. Wie dem auch sei, es zeigt, dass der gemessene Anstieg in der Rotationskorrelationszeit von adsorbiertem  $\alpha$ -LA auf einer PAS-Bürste gut mit einer erhöhten Viskosität innerhalb der PAS-Bürste, im Vergleich zu Wasser, erklärt werden kann (Gleichung 5.4-3). Demnach führt die Wechselwirkung zwischen dem Proteinmolekül und den PAS-Ketten nicht zu einer signifikanten Verlangsamung

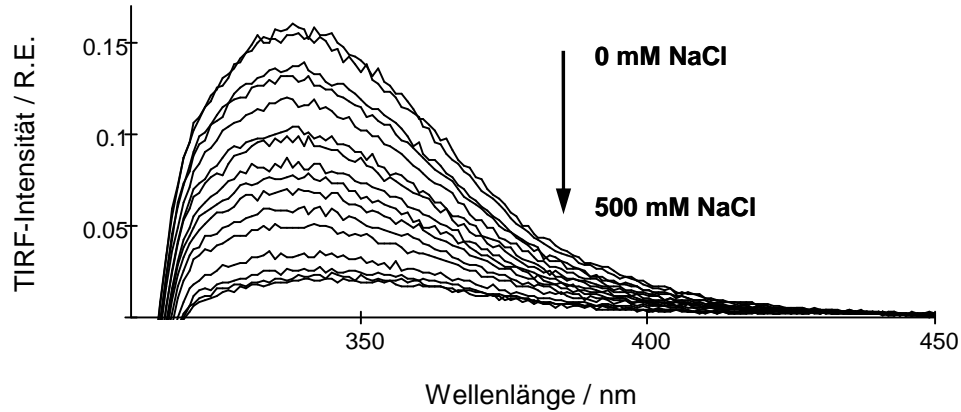
der Rotationsmobilität der adsorbierten Proteinmoleküle. Offenbar sind keine festen Bindungen zwischen dem Protein und den PAS-Ketten notwendig, um das Protein innerhalb der PAS-Bürsten zu halten. Die hohe Mobilität von  $\alpha$ -LA ist sicherlich verbunden mit der Tatsache, dass beide, das Protein und die PAS-Bürste, negativ geladen sind. Demgemäß muss die elektrostatisch abstoßende Wechselwirkung groß genug sein, um die PAS-Ketten von der Proteinoberfläche weitgehend fernzuhalten.

#### **5.4.2 TIRF-Experimente zum Einfluss der Salz-, Protonen- und Proteinkonzentration auf den Adsorptionsgrad von BSA und Lysozym an PAS-Bürsten [69]**

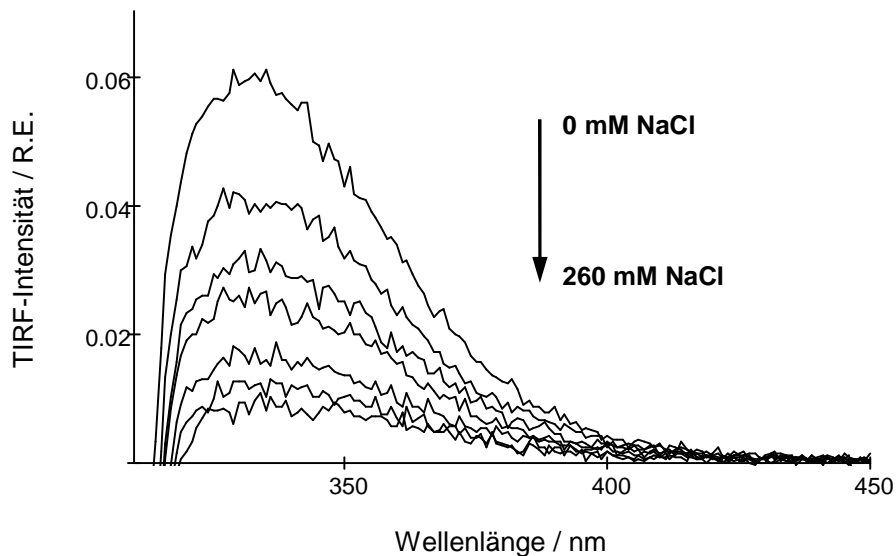
In Abbildung 5.4-4 sind TIRF-Spektren von Lysozym, das auf einer PAS-Bürste adsorbiert ist, abgebildet. Die Trp-Reste des Proteins dienen hier als intrinsische Fluorophore. Die Lysozymlösung hatte eine Konzentration von  $0.07 \text{ mg mL}^{-1}$  und war auf  $\text{pH} = 6.6$  eingestellt. Bei diesem pH-Wert trägt Lysozym eine positive Nettoladung und wechselwirkt mit der PAS-Bürste unter elektrostatischer Anziehung (der isoelektrische Punkt von Lysozym liegt bei  $\text{pH} = 11.1$  und die Nettoladung bei  $+8e$  bei  $\text{pH}=7$  [85]). Beim Erhöhen der Ionenstärke der Proteinlösung durch Zusatz von NaCl wurde das TIRF-Signal stark abgeschwächt (Abb. 5.4-5). Dieser Salz-Effekt lässt sich mit einem Abschirmen der attraktiven, elektrostatischen Wechselwirkungskräfte zwischen dem Protein und der Grenzfläche erklären, was zur Verringerung des Adsorptionsgrades führt. Eine salzinduzierte Verminderung des Adsorptionsgrades wurde für Lysozym auch an einer geladenen Wasser / Silizium Grenzfläche gefunden [86, 87].

Zusätzlich zu Lysozym wurde die Adsorption von BSA an einer planaren PAS-Bürste mittels der TIRF-Spektroskopie untersucht. Auch hier sind Trp-Reste die Fluorophore. Die zugehörigen Spektren sind in Abbildung 5.4-5 zu sehen. Wie schon bei Lysozym gefunden wurde, lässt sich ein starker Rückgang der Fluoreszenzintensität beobachten, wenn der Proteinlösung in der TIRF-

Probenzelle NaCl zugesetzt wird, was einen verringerten Adsorptionsgrad bei erhöhter Ionenstärke aufzeigt.



*Abb. 5.4-4* TIRF-Spektren von adsorbiertem Lysozym an einer PAS-Bürste. Die Proteinlösung wurde auf pH = 6.6 eingestellt. Eine steigende NaCl-Konzentration verursacht eine starke Abnahme des Fluoreszenzsignals.



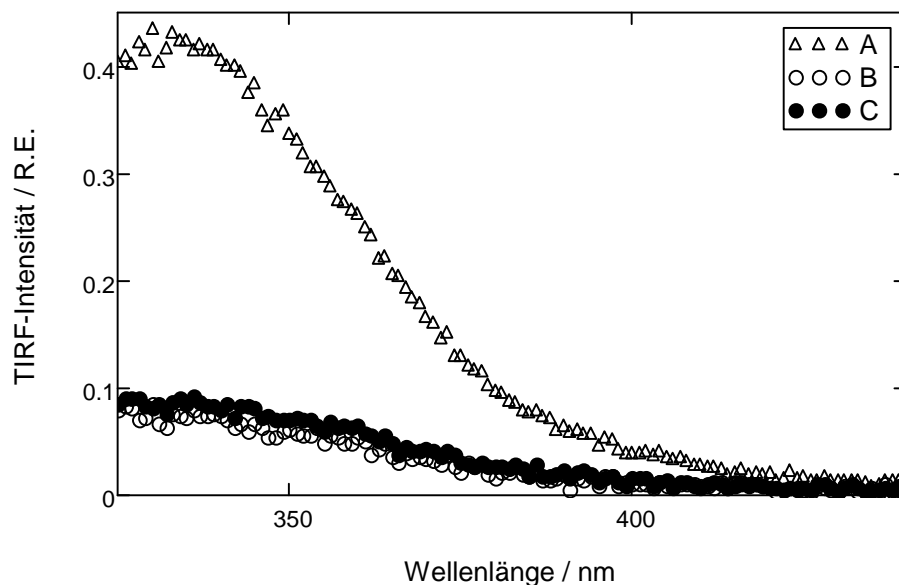
*Abb. 5.4-5* TIRF-Spektren von adsorbiertem BSA an einer planaren PAS-Bürste. Die Proteinlösung wurde auf pH = 6.1 eingestellt. Wie schon bei Lysozym gefunden wurde, führt eine Erhöhung der NaCl-Konzentration zu einem starken Rückgang der Fluoreszenzintensität.

Diese Daten wurden bei pH = 6.1 aufgenommen, sehr ähnliche Daten konnten bei pH = 7.0 erhalten werden (nicht gezeigt). Beachtenswert ist, dass BSA einen isoelektrischen Punkt von etwa 4.6 besitzt, folglich eine negative Nettoladung für pH > 5 (-18e bei pH = 7 [88]) hat und dennoch an einer PAS-Bürste unter elektrostatischer Abstoßung adsorbiert. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis wäre zu erwarten gewesen, dass eine erhöhte Ionenstärke die Ladungen abschirmt und damit die Abstoßung abschwächt, wodurch Proteinadsorption begünstigt wäre, wie man es schon für andere Proteinsysteme, bei denen die Ladungsverhältnisse gleich waren, gefunden hatte [89,90]. Eine planare PAS-Bürste stellt deshalb ein einzigartiges Proteinsubstrat dar, das sich je nach der Ionenstärke in der Proteinlösung in einen Zustand mit hoher Proteinaffinität und einen Zustand mit niedriger Proteinaffinität „schalten“ lässt, und das unabhängig von der Nettoladung des Proteins.

Man könnte annehmen, dass die beobachtete salzinduzierte Abnahme der TIRF-Intensität von Lysozym und BSA (Abb. 5.4-5 und 5.4-6) aufgrund von Fluoreszenzlöschung durch NaCl zustande gekommen ist. Es wurde deshalb, um den Einfluss von NaCl auf die Tryptophan-Fluoreszenzintensität von Lysozym und BSA zu charakterisieren, von beiden Proteinen ein konventionelles Fluoreszenz-Spektren in Lösung bei pH = 7 aufgenommen. Über den gesamten Bereich von 0-500 mM NaCl ist die integrale Fluoreszenzintensität nicht mehr als um 10% gesunken, was deutlich zeigt, dass Fluoreszenzlöschung nahezu vernachlässigbar ist.

Da die evaneszente Welle, die an der Quarz / Lösung - Grenzfläche entsteht, möglicherweise über die PAS-Bürste hinaus in die Lösung hineinreicht, könnten die TIRF - Intensitäten von Lysozym und BSA auch von gelösten und adsorbierten Proteinmolekülen stammen. Um den Anteil von gelösten, nicht adsorbierten Proteinmolekülen am TIRF-Signal zu quantifizieren, wurde das folgende Experiment durchgeführt: Eine BSA-Lösung mit pH = 6.1 und der Konzentration  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  wurde in Kontakt mit einer planaren PAS-Bürste gebracht. Anschließend wurde ein TIRF-Spektrum aufgenommen, das die Anwesenheit von BSA-Molekülen innerhalb der evaneszenten Welle anzeigt

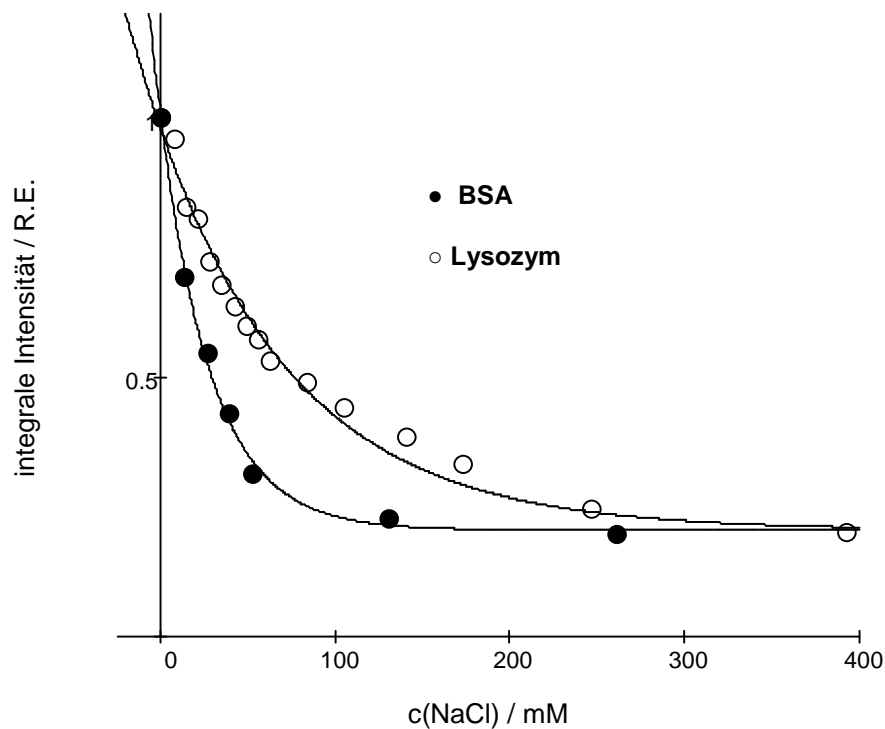
(Abb.5.4-6 A). Dann wurde nach Erhöhung der NaCl-Konzentration in der TIRF-Probenzelle auf 300mM ein zweites TIRF-Spektrum aufgenommen (Abb.5.4-6 B). Wie zu erwarten, ist in der zweiten Messung ein deutlich geringeres TIRF-Signal aufgrund salzinduzierter Desorption von BSA erhalten worden. Nun wurde die BSA-Konzentration in der TIRF-Probenzelle auf eine Konzentration von 0.2 mg mL<sup>-1</sup> erhöht und ein drittes Spektrum aufgenommen (Abb.5.4-6 C). Offenbar hat die Verdoppelung der Konzentration in Anwesenheit von 300 mM NaCl die TIRF-Intensität nicht signifikant verändert. Wenn gelöste Proteinmoleküle einen Teil zum TIRF-Signal beitragen würden, hätte ein starker Anstieg in der Fluoreszenzintensität aufgrund der höheren Proteinkonzentration stattfinden müssen. In den hier aufgeführten Experimenten kann also kein Fluoreszenzlicht aus der Proteinlösung stammen.



*Abb.5.4-6* TIRF-Spektren von BSA an einer planaren PAS-Bürste bei unterschiedlichen Lösungsbedingungen (pH = 6.1): (A) 0.1 mg mL<sup>-1</sup> BSA ohne NaCl, (B) 0.1 mg mL<sup>-1</sup> mit 300 mM NaCl, (C) 0.2 mg mL<sup>-1</sup> BSA mit 300 mM NaCl. In Gegenwart von 300 mM NaCl hat bei einer größtenteils proteinresistenten PAS-Bürste eine Verdoppelung der Proteinkonzentration der Lösung zu keiner signifikanten Änderung in der TIRF-Intensität geführt.



Da also Fluoreszenzlöschung durch NaCl und Fluoreszenzlicht aus der Proteinlösung vernachlässigt werden können, ist die Fluoreszenzintensität in den TIRF-Spektren von Lysozym und BSA wie sie in Abbildung 5.4-4 und 5.4-5 dargestellt ist, ein Maß für die Anzahl der adsorbierten Proteinmoleküle. Die integrale Fluoreszenzintensität von Lysozym und BSA an einer planaren PAS-Bürste wurde über den Wellenlängenbereich von 320 - 450 nm berechnet und in Abbildung 5.4-7 als Funktion der NaCl-Konzentration aufgetragen.



*Abb. 5.4-7* Integrale Fluoreszenzintensität von Lysozym und BSA adsorbiert an einer planaren PAS-Bürste. Bei Erhöhung die Ionenstärke der Proteinlösungen um wenige 100 mM wird nahezu Proteinresistenz erreicht. Bei den gewählten experimentellen Bedingungen trägt BSA eine negative und Lysozym eine positive Nettoladung.

In Abbildung 5.4-7 lässt sich sehen, dass die Anzahl adsorbierter Lysozym- und BSA-Moleküle bei Erhöhung der Ionenstärke um wenige 100 mM um mehr als

80% zurückgeht. Der verbleibende geringe Adsorptionsgrad von Lysozym bzw. BSA wird bei NaCl - Konzentrationen im Bereich von 100-250 mM erreicht.

Interessant ist ebenfalls, die Reversibilität der Proteinadsorption an einer planaren PAS-Bürste zu untersuchen. Gewöhnlich wird die Proteinadsorption als irreversibel als Funktion der Proteinkonzentration beschrieben, das heißt, eine vollständige Desorption lässt sich nicht durch Herabsetzen der Proteinkonzentration auf Null erreichen. In Abbildung 5.4-8 ist die integrale Fluoreszenzintensität von BSA an einer planaren PAS-Bürste gegen die Proteinkonzentration in der Lösung aufgetragen. Datenserien mit steigender und fallender Konzentration sind im gleichen Diagramm gegeben. Ein TIRF-Spektrum wurde alle 10 Minuten nach Wechsel der Proteinlösung aufgenommen. Wie sich in Abbildung 5.4-9 sehen lässt, scheint die Proteinadsorption von BSA an einer planaren PAS-Bürste nahezu vollständig reversibel zu sein. Wird die Konzentration der Proteinlösung vom Maximalwert von  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  auf  $0 \text{ mg / mL}$  gesenkt, ist die Anzahl an adsorbierten Proteinmolekülen auf etwa 10% vermindert. Dieser hohe Grad an Reversibilität konnte für sphärische PAS-Bürsten nicht gefunden werden [90]. In diesen Studien wurden jedoch BSA und die sphärischen PAS-Bürsten vermischt und für 24 Stunden gerührt. Nach dieser langen Inkubationszeit, führt das Waschen der Teilchen mit reiner Pufferlösung nicht zu einer wesentlichen Desorption von adsorbierten BSA-Molekülen. Zum Vergleich ist die Adsorption von Lysozym an einer planaren PAS-Bürste nur teilweise reversibel. Das Ausmaß der Adsorption verringerte sich um 50%, wenn eine planare Bürste, an der Lysozym adsorbiert war, nach 10 Minuten mit Pufferlösung gespült wurde (Daten nicht aufgeführt). Die attraktive Coulomb-Wechselwirkung zwischen Lysozym und PAS könnte für diese Beobachtung verantwortlich sein.

Durch Verändern des pH-Wertes einer Proteinlösung kann die Nettoladung der Proteinmoleküle variiert werden. Es ist hier von besonderem Interesse, den Effekt des pH-Wertes auf den Grad der Adsorption von BSA an einer planaren PAS-Bürste zu untersuchen, da BSA unter elektrostatischer Abstoßung bei  $\text{pH} >$

5 adsorbiert. In Abbildung 5.4-9 sind TIRF-Spektren von BSA an einer planaren PAS-Bürste für verschiedene pH-Werte der BSA-Proteinlösungen dargestellt. Es ist ein ausgeprägter Effekt des pH-Wertes auf die TIRF-Intensität zu sehen. Mit steigendem pH-Wert, erhöht sich die negative Nettoladung der BSA-Moleküle, was den Adsorptionsgrad erniedrigt.

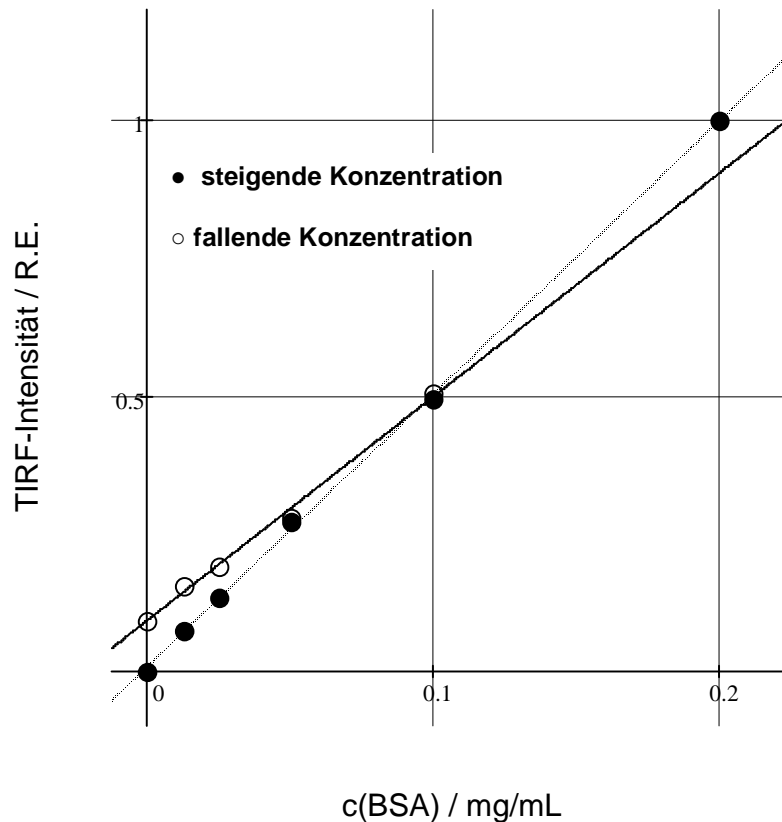


Abb. 5.4-9 Grad der BSA-Adsorption an einer planaren PAS-Bürste als Funktion der Proteinkonzentration (pH = 6.0). Die integrale Fluoreszenzintensität wurde aus TIRF-Spektren erhalten, die mit steigender und fallender Proteinkonzentration aufgenommen wurden. Alle 10 Minuten wurde ein TIRF-Spektrum aufgenommen, nachdem in der Probenzelle eine neue Proteinkonzentration eingestellt wurde.

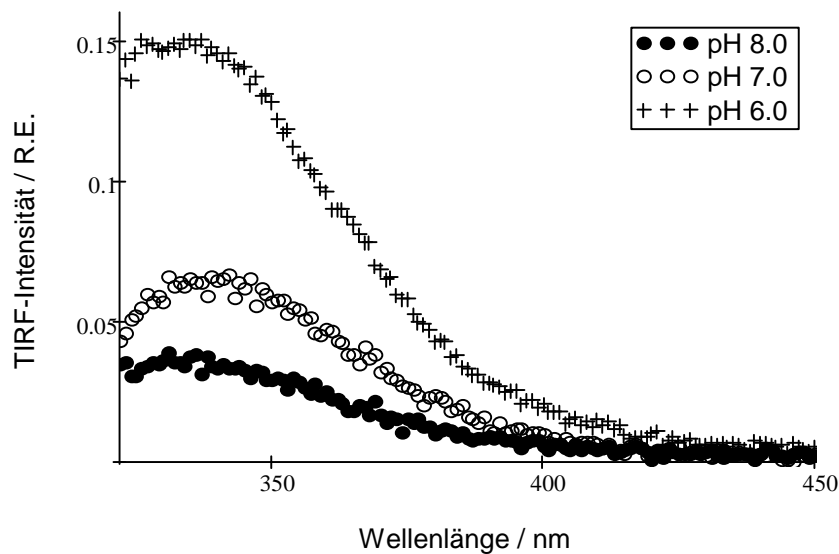


Abb. 5.4-10 TIRF-Spektren von BSA an einer planaren PAS-Bürste bei verschiedenen pH-Werten der Proteinlösung. BSA hat eine negative Nettoladung für pH-Werte  $> 5$ .

Aus der integralen Fluoreszenzintensität lässt sich, relativ zur Oberflächenkonzentration von BSA bei  $\text{pH} = 6$ , ein relativer BSA-Bedeckungsgrad von etwa 50 und 20% bei  $\text{pH} = 7$  beziehungsweise 8 bestimmen. Anzumerken wäre, dass die negative Ladung der PAS-Bürsten, im Bereich von  $\text{pH} = 6-8$ , unwesentlich verschieden ist, wie sich aus der Höhe einer PAS-Bürste als Funktion des pH-Wertes entnehmen lässt [91]. Dennoch ist es interessant zu sehen, dass selbst bei  $\text{pH} = 8$  noch signifikante Adsorption von BSA an einer planaren PAS-Bürste stattfindet. Demnach muss es eine Triebkraft für die Proteinadsorption an einer planaren PAS-Bürste geben, die die starken elektrostatischen Abstoßungskräfte bei  $\text{pH} = 8$  überkompensiert.

### 5.4.3 TIRF- Experimente zum Einfluss der Temperatur auf den Adsorptionsgrad von BSA an Polyacrylsäure-Bürsten [56]

Um den Einfluss der Temperatur auf den Adsorptionsgrad von BSA an einer planaren PAS-Bürste zu untersuchen wurden, ebenfalls TIRF-Experimente durchgeführt. Die PAS-Bürste wurde auf einer Quarzoberfläche, wie es im experimentellen Teil der Arbeit (Abschnitt 4.2) beschrieben wird, präpariert. BSA wurde mit Alexa 488 Farbstoff markiert und bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 485$  nm angeregt. In Abbildung 5.4-11, ist die TIRF-Intensität einer PAS-Bürste mit adsorbiertem BSA als Funktion der Temperatur abgebildet (das Fluoreszenzlicht wurde hier über einen *long-pass*-Emissionsfilter mit 50% Transmission bei 515 nm gemessen). Wie sich in der Abbildung sehen lässt, steigt das TIRF-Signal deutlich mit der Temperatur an. Da die Fluoreszenzintensität von nicht adsorbiertem, gelöstem BSA beim Erhitzen von 20 auf 80°C um etwa 50% sinkt (nicht gezeigt), zeigt dieses Verhalten eine temperaturinduzierte Erhöhung des Adsorptionsgrades von BSA. Demnach ist anzunehmen, dass die Adsorption von BSA an einer PAS-Bürste, mit einem Entropiegewinn verbunden ist.

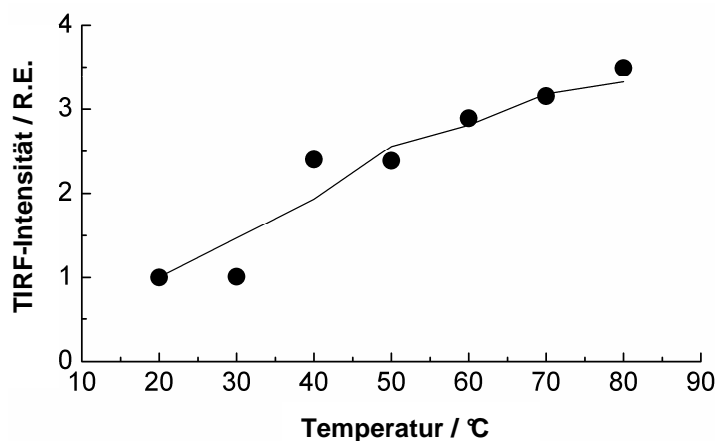


Abb. 5.4-11 TIRF-Intensität von adsorbiertem BSA an einer PAS-Bürste als Funktion der Temperatur. BSA wurde mit Alexa 488-Farbstoff markiert. Die BSA-Lösung hat eine Konzentration von 0.17 mg / mL und ist auf pH = 7 eingestellt. Die Linie soll den Verlauf der Intensität verdeutlichen.

Es ist zu beachten, dass die Daten, die in Abbildung 5.4-11 dargestellt sind, ohne eine vorherige Wärmebehandlung der PAS-Bürste, wie sie in den Neutronenstreuexperimenten in Abschnitt 5.3.2 beschrieben ist, gemessen wurde. Um die TIRF-Experimente besser mit den Neutronenstreuexperimenten vergleichbar zu machen, wurde deshalb eine PAS-Bürste für 3 Stunden in Kontakt mit einer Pufferlösung gebracht, die eine Temperatur von 40°C hatte, und anschließend wieder auf 20°C abgekühlt. Während dieses Zeitraums ist die PAS-Bürste wahrscheinlich aufgequollen, so wie es in den Neutronenstreuexperimenten (Abschnitt 5.3.2, S. 64) gefunden wird. Es wurde anschließend ein Spektrum bei 20 °C in Gegenwart von BSA aufgenommen (Abb. 5.4-12). Danach wurde die Probe auf 40°C erwärmt und ein weiteres TIRF-Spektrum aufgenommen (Abb. 5.4-12). Aus den Intensitäten der TIRF-Spektren lässt sich schließen, dass die Menge an adsorbiertem BSA ansteigt, wenn die Temperatur von 20 auf 40°C erhöht wird. Der Anstieg im Adsorptionsgrad mit steigender Temperatur lässt wieder eine entropische Triebkraft für die BSA-Adsorption an einer planaren PAS-Bürste annehmen. Dazu sollte beachtet werden, dass der Anstieg in der TIRF-Intensität beim Erwärmen von 20 auf 40°C, wie er jeweils in Abbildung 5.4-11 und 5.4-12 zu sehen ist, nicht in quantitativer Art und Weise vergleichbar ist.

Nach Austausch der BSA-Lösung in der TIRF-Zelle durch eine BSA-Lösung mit einer NaCl-Konzentration von 500 mM konnte bei 40°C ein starker Anstieg in der TIRF-Intensität festgestellt werden (Abbildung 5.4-12). Diese Beobachtung ist in Einklang mit den Neutronenstreuexperimenten in Abschnitt 5.3.2, bei denen ebenfalls ein höherer Adsorptionsgrad von BSA in Gegenwart NaCl in einer Konzentration von 500 mM gefunden wurde. Demnach wirkt sich die Erhöhung der Ionenstärke auf das Adsorptionsverhalten von BSA an einer planaren PAS-Bürste bei 40°C entgegengesetzt zu dem bei 20°C aus .

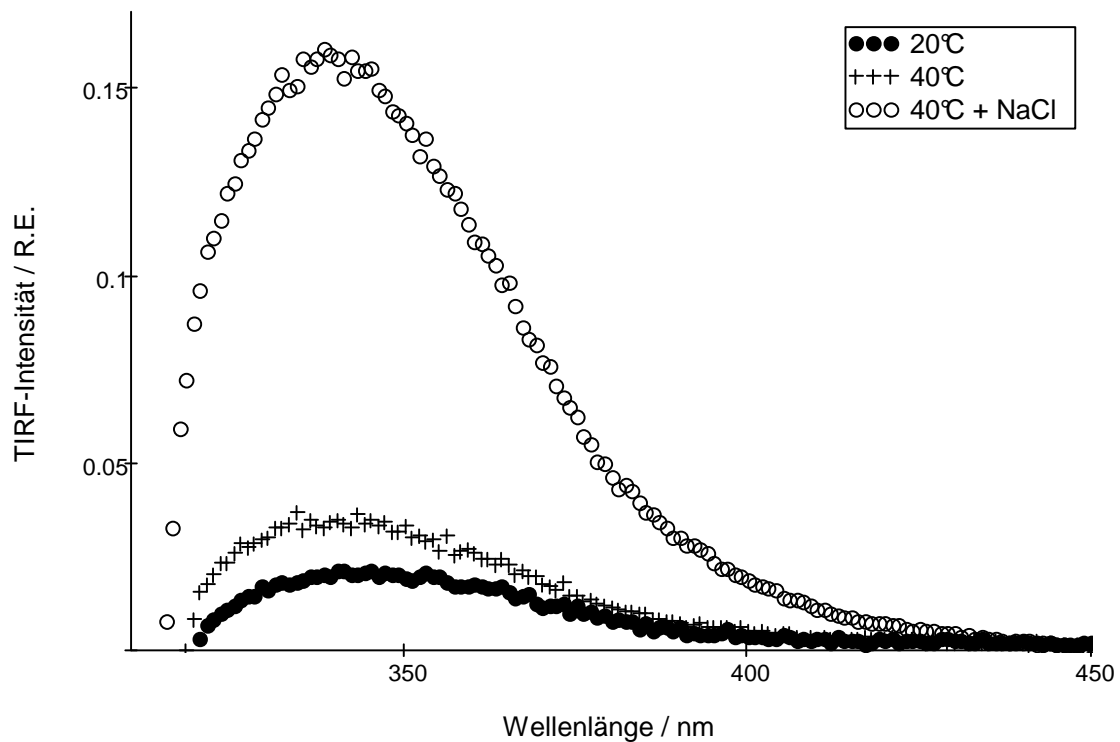


Abb. 5.4-12 TIRF Spektrum von adsorbiertem BSA an einer PAS-Bürste. Das BSA wurde mit Alexa Fluor 488 Farbstoff markiert. Die Lösung hat eine BSA-Konzentration von  $0.09 \text{ mg mL}^{-1}$  und einen pH von 7.

Wie in Abschnitt 5.2 schon im Detail diskutiert wurde, ist die Proteinadsorption an einer PAS-Bürste bei Raumtemperatur sehr wahrscheinlich durch eine Freilassung von Gegenionen getrieben [46, 92]. Diese Triebkraft ist konsistent mit der allgemeinen Proteinresistenz einer PAS-Bürste bei Ionenstärken im Bereich von wenigen 100 mM [46, 69, 70, 71, 72]. Interessanterweise wurde bei der Adsorption von BSA an positiv geladenem Polyallylaminhydrochlorid ebenfalls ein Mechanismus vorgestellt, der die Freilassung von Gegenionen als treibende Kraft beinhaltet [93], was die Bedeutung von Gegenionen auf die Adsorption von Proteinen an Polyelektrolyten unterstreicht. Da in der gegenwärtigen Studie ein Erhöhen der Salzkonzentration bei 40°C zu einer stärkeren Adsorption von BSA an einer PAS-Bürste geführt hat, muss eine andere Triebkraft für die Adsorption

bei dieser erhöhten Temperatur dominieren. Zu diesem Zeitpunkt kann über den Mechanismus nur spekuliert werden. Es ist gut möglich, dass BSA bei einer Temperatur von 40°C in einer PAS-Bürste teilweise entfaltet wird, obwohl es in Lösung erst bei höherer Temperatur von 60°C entfaltet [94]. Wie bei adsorbierter RNase A an sphärischen PAS-Bürsten gefunden wurde, führt die Wechselwirkung des Proteins mit der PAS-Bürste zu einer Erniedrigung der Entfaltungstemperatur um 10°C [95]. Außerdem wurde gefunden, dass das thermische Entfalten von RNase A in einer PAS-Bürste irreversibel verläuft. Der gleiche Effekt könnte bei BSA auftreten. Ein teilweises Entfalten von BSA bei 40°C in einer PAS-Bürste, begleitet von Proteinaggregation und Verwicklung mit den PAS-Ketten könnte die beobachtete salzinduzierte BSA-Adsorption an einer PAS-Bürste erklären, da eine Freilassung von Gegenionen nur bei einer Proteinoberfläche mit intakten Ladungsbereichen stattfinden kann [46, 94]. Ohne diese Bereiche führt ein Zusatz von Salz nur zu einem Abschirmen der elektrostatischen und einer Verstärkung hydrophober Wechselwirkungen.



## 6 Zusammenfassung

Der Kontakt zwischen biologischen Molekülen und Materialoberflächen ist von steigendem Interesse für viele medizinische und biotechnische Anwendungen. Beispiele sind medizinische Implantate, Biosensoren und Protein-Biochips. Polyelektrolyte erscheinen hierfür als viel versprechend um biokompatible Oberflächen zu erhalten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb das Adsorptionsverhalten verschiedener Proteine auf Polymeroberflächen insbesondere Polyacrylsäurebürsten, unter Variation verschiedener Umgebungsparameter, systematisch mit Hilfe der TIRF- und SPR-Spektroskopie sowie der Neutronenreflektometrie untersucht.

### *Kinetik der Proteinadsorption an einer Polyacrylsäurebürste*

Mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) wurde die Kinetik von Lysozym und BSA an einer planaren Polyacrylsäurebürste untersucht. Die experimentellen Ergebnisse zeigen eine sehr schnelle Adsorption für Lysozym. Die entsprechende Adsorptionsrate ist proportional zur Konzentration der Proteinlösung, was einen diffusionskontrollierten Adsorptionsmechanismus nahe legt. Im Vergleich dazu verläuft die BSA-Adsorption mit etwa dem Faktor 100 deutlich langsamer und das Plateau der Adsorptionsisotherme stellt sich bei gleicher Konzentration und bei  $\text{pH} = 7$  bei deutlich niedrigerem Wert ein. Für beide Proteine wurde die Proteinadsorption als weitgehend irreversibel gegen Verdünnen der Proteinlösung gefunden. Wirkungsvolle Desorption konnte durch Spülen mit einer NaCl-Pufferlösung der Konzentration 500 mM erreicht werden. Die salzinduzierte Desorption der beiden Proteine von der Polyacrylsäure-Bürste findet innerhalb eines Zeitraums von nur etwa 1-2 Sekunden statt. Als Triebkraft für die Desorption kommt dabei neben dem

Abschirmen von attraktiven elektrostatischen Wechselwirkungskräften zwischen Protein und Polyelektrolytketten ein Kollaps der Bürstenstruktur in Betracht. Insgesamt unterstützt diese Untersuchung die Vorstellung, dass die Adsorptionsmechanismen von Proteinen mit positiver und negativer Nettoladung verschieden sind.

#### *Untersuchungen zum Adsorptionsgrad von Proteinen an einer Polyacrylsäure-Bürste unter Variation verschiedener Parameter*

Die Adsorption von Proteinen an einer planaren Polyacrylsäurebürste wurde als Funktion der Ionenstärke, der Proteinkonzentration, der Temperatur und des pH-Wertes mit Hilfe der TIRF-Spektroskopie und der Neutronenreflektometrie untersucht. Lysozym und BSA wurden dazu als Modellproteine mit positiver und negativer Nettoladung bei neutralem pH-Wert gewählt. Während Lysozym unter elektrostatischer Anziehung bei neutralen pH-Werten mit einer Polyacrylsäure-Bürste wechselwirkt, findet bei BSA eine Adsorption bei pH-Werten  $> 5$  auch unter elektrostatischer Abstoßung statt. Selbst bei pH 8 konnten im TIRF-Experiment noch signifikante Mengen von BSA an den planaren Polyacrylsäurebürsten gefunden werden. Bei kurzen Proteinkontaktzeiten ist bei BSA im TIRF-Experiment, im Gegensatz zu Lysozym, nahezu vollständige Reversibilität der Adsorption beobachtet worden. Es wurde für beide Proteine ein hoher Adsorptionsgrad bei niedrigen Ionenstärken gefunden. Bei Erhöhung der Ionenstärke in den Bereich von 100-200 mM erscheint die Polyacrylsäurebürste bei 20°C gegenüber der Adsorption von Proteinen, unabhängig von deren Nettoladung, als weitgehend resistent. Bei 40°C und erhöhter Ionenstärke ist dagegen die Proteinaffinität der Polyacrylsäurebürste im Neutronenstreu- wie auch im TIRF-Experiment gegenüber BSA scheinbar erhöht. Zusätzlich konnte im TIRF-Experiment ein erhöhter Adsorptions-grad von BSA nach Erhöhung der Temperatur festgestellt werden, was für einen Adsorptionsmechanismus auf Basis einer entropiegetriebenen Kraft für die Proteinadsorption an planaren Polyacrylsäurebürsten spricht. Im Gegensatz dazu wurde im Neutronenstreu-

experiment für  $\alpha$ -LA ein zu BSA entgegengesetztes Adsorptionsverhalten an Polyacrylsäurebürsten in Abhängigkeit der Temperatur festgestellt, was eine enthalpische Triebkraft für die Adsorption von  $\alpha$ -LA an einer planaren Polyacrylsäurebürste annehmen lässt. Offensichtlich scheint der Mechanismus der Adsorption auch von der spezifischen Struktur der Proteine bestimmt werden.

#### *Experimente zur Verteilung von Proteinmolekülen in einer Polyelektrolytbürste*

Die Verteilung von Proteinmolekülen in Polyacrylsäurebürsten wurde mit der Methode der Neutronenreflektometrie untersucht. Bei 20°C wurde dabei eine gleichmäßige Verteilung mit einem Volumenbruchanteil von etwa 7-10% für  $\alpha$ -LA wie auch BSA innerhalb der Polyacrylsäurebürsten festgestellt. Proteinanreicherungen an den Enden der Bürsten konnten im Streulängendichteprofil nicht gesehen werden. Es ist vielmehr so, dass sich der Großteil des Adsorbats dort befindet, wo die Dichte an Polyacrylsäureketten maximal ist. Eine signifikante Änderung dieser Verteilung konnte bei Temperaturerhöhung auf 40°C für  $\alpha$ -LA nicht beobachtet werden. Es änderte sich jedoch die Menge an adsorbiertem Protein, so dass der Volumenbruch über die gesamte Bürste bei 40°C kleiner für  $\alpha$ -LA ausfällt.

#### *Experimente zur Dynamik von Proteinmolekülen, die an einer Polyacrylsäure-Bürste adsorbiert sind*

Aus der Analyse der TIRF-Daten konnte auf eine hohe Rotationsmobilität von  $\alpha$ -LA innerhalb einer Polyacrylsäure-Bürste geschlossen werden. Die Rotationskorrelationszeit von  $\alpha$ -LA änderte sich beim Übergang von der Lösung in den adsorbierten Zustand innerhalb der Bürste von 5.5 ns auf 32 ns. Dieser Anstieg ist mit der Annahme einer höheren Viskosität innerhalb der Bürsten in der Größenordnung, wie man ihn erwarten würde. Rotationsbeweglichkeit des Proteinmoleküls innerhalb der PAS-Bürsten scheint also in großem Maße

gegeben zu sein. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass diese Studie eine planare Polyacrylsäurebürste als viel versprechende Oberflächenbeschichtung charakterisiert, die in der Lage ist, ein Protein zu binden, ohne dabei dessen Dynamik „einzufrieren“, was eine Vorbedingung für biologische Aktivität ist.

#### *Untersuchungen zur Adsorption von Insulin an einer Polyelektrolytmultischicht*

Bei diesen Messungen wurde die Adsorption von Insulin an Polyelektrolytmultischichten, die aus negativ geladenen PSS- und positiv geladenen PAH-Schichten aufgebaut wurden, mit Hilfe der Methode der Neutronenstreuung untersucht. Außerdem wurden zum Vergleich Experimente zum Adsorptionsverhalten von Insulin auf einer hydrophoben d-PS-Oberfläche gemacht. Es wurde gefunden, dass die Menge an adsorbiertem Insulin an einer d-PS – Schicht weitgehend unabhängig vom variierten Temperatur- und Ionenstärkebereich ist. Dennoch sind im entsprechenden Streulängendichteprofil deutliche Unterschiede in der Dichte und Eindringtiefe des Adsorbates festzustellen.

An einer Polyelektrolytmultischicht, die mit negativ geladenem PSS als letzte Schicht abgeschlossen wurde, ist bei  $pD = 7.4$  und  $20^{\circ}C$  ein deutlich höherer Adsorptionsgrad von Insulin festgestellt worden als an einer Multischicht, die mit positiv geladenem PAH als letzte Schicht präpariert wurde. Dieses Ergebnis ist unerwartet, da Insulin bei diesem  $pD$ -Wert eine negative Nettoladung trägt. Möglicherweise ist die hohe Neigung zur Selbstassoziation von Insulin mitverantwortlich für das gefundene Verhalten. Es steht allerdings in Einklang mit einer Studie zur Insulin-Amyloidbildung an Lipidmembranen [77].

## 7 Literatur

1. M.Malmsten [ed.], *Biopolymers at interfaces*, Marcel Dekker, New York **2003**.
2. A.Baszkin and W.Norde (eds.), *Physical chemistry of biological interfaces*, Marcel Dekker, New York, **2000**.
3. T.A.Horbett and J.L. Brash (eds.), *Proteins at interfaces II*, American chemical Society, Washington DC, **1995**.
4. J.L.Brash and T.A.Horbett (eds.), *Proteins at interfaces*, American chemical society, Washington DC, **1987**.
5. J.D.Andrade (ed.), *Surface and interfacial aspects of biomedical polymers*, Vol. 1 and 2, Plenum Press, New York, **1985**.
6. C.M. Niemeyer and C.A. Mirkin, *Nanobiotechnology*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
7. B. Kasemo, Curr. Opin. Solid State Mater. Sci., **1998**, 3, 351.
8. F.Lottspeich, H.Zorbas (eds.), *Bioanalytik*, Spektrum, Heidelberg, **1998**.
9. S.R. Weinberger, T.S. Morris, and M. Pawlak, *Pharmacogenomics*, **2000**, 1, 395.
10. C.Janiak, Chem. unserer Zeit, **2001**, 35, 348.
11. M.J.Sever, J.T.Weisser, J.Monahan, S.Srinivasan und J.J. Wilker, Angew. Chem., **2004**, 116, 454-456.
12. Wittemann, A.; Haupt, B; Ballauff, M., Phys. Chem. Chem. Phys., **2003**, 5, 1671-1677.
13. C.Czeslik, Z.Phys.Chem., **2004**, 218, 771-801.
14. P.C.Hiemenz und R.Rajagopalan, *Principles of colloid and surface chemistry*, Marcel Dekker, New York, **1997**.
15. C.M.Roth, B.L. Neal, and A. M. Lenhoff, Biophys. J., **1996**, 70, 977.
16. B.J.Yoon, A.M. Lenhoff, J.Phys.Chem. , **1992**, 96, 3130.
17. B.J.Yoon, A.M. Lenhoff, Langmiur, **1993**, 9, 962.
18. T.E. Creighton, *Proteins*, W.H. Freeman, New York, **1993**.
19. W. Norde, Macromol. Symp., **1996**, 103, 5.
20. T. Arai und W. Norde, Colloids Surf. **1990**, 51, 1.

21. F. Ahmad, C. C. Bigelow, J. Biol. Chem., **1982**, 257, 12935-12938.
22. <http://www.povray.org/>
23. Acharya, K.R., Stuart, D.I., Walker, N.P., Lewis, M., Phillips, D.C., J.Mol.Biol., **1998**, 208, 99-127.
24. <http://www.rcsb.org/pdb/>
25. Acharya, K.R., Ren, J., Stuart, D.I., Phillips, D.C. and Fenna, R.E., J. Mol. Biol., **1991**, 221, 571-581.
26. Acharya, K.R., Stuart, D.I., Phillips, D.C., McKenzie, H.A., Teahan, C.G., J. Protein Chem., **1994**, 13, 569-584.
27. O. D. Velev, E. W. Kaler, and A. M. Lenhoff, Biophys. J., **1998**, 75, 2682-2697.
28. Harata, K., Muraki, M., Jigami, Y. J.Mol.Biol. **1993**, 233, 524-535.
29. Sjöholm, I., and Ljungstedt, I., J. Biol. Chem., **1973**, 248, 8434-8441.
30. Wright, A.K., Thompson, M. R., Biophys. J., **1975**, 15, 137-141.
31. Steinhardt, J., Stocker, N., Biochemistry, **1973**, 12, 2798-2802.
32. Katchalski, E., Benjamin, G. S., Gross, V., J. Am. Chem. Soc., **1957**, 75, 5154-5157.
33. Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., Kobayashi, K. Protein Eng., **1999**, 12, 439-446.
34. Whittingham, J.L., Scott, D.J., Chance, K., Wilson, A., Finch, J., Brange, J., Dodson, G.G. Insulin at Ph2: *Structural Analysis of the Conditions Promoting Insulin Fibre Formation*, To be Published
35. R. Winter / F. Noll, *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Teubner, Stuttgart, **1998**.
36. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, **2006**.
37. B. Valeur und G. Weber, Photochem Photobiol., **1977**, 25, 441.
38. G. Lipari und A. Szabo, J. Am. Chem. Soc., **1982**, 104, 4546.
39. Russell, T. P. Mater. Sci. Rep. **1990**, 5, 171-271.
40. M. Tolan und W. Press, Z. Kristallogr., **1998**, 213, 319.
41. W. N. Hansen, J. Opt. Soc. Am., **1968**, 58, 380.

42. M. Born und E. Wolf, *Principles of optics*, Cambridge University Press, Cambridge, **1999**.
43. A.K. Convington, M. Paabo, R. A. Robinson und R. G. Bates, *Anal. Chem.*, **1968**, *40*, 700.
44. E.P. Currie, A. B. Sieval, M. Avena, H. Zuilhof, E. J. R. Sudhölter und M. A. Cohen Stuart, *Langmuir*, **1999**, *15*, 7116.
45. W. Kern, *J. Electrochem. Soc.*, **1990**, *137*, 1887.
46. C. Czeslik, G. Jackler, R. Steitz, und H.-H. von Grünberg, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, *108*, 13395-13402.
47. G. Decher, *Science*, **1997**, *277*, 1232-1237.
48. F. Mezei, R. Golub, F. Klose and H. Toews, *Physica B*, **1995**, *213&214*, 898.
49. Gupta, M.; Gutberlet, T.; Stahn, J.; Keller, P.; Clemens, D. *Pramana – J. Phys.* **2004**, *63*, 57-63.
50. E. Gratton, D. M. Jameson and R. D. Hall, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **1984**, *13*, 105.
51. E. Gratton and M. Limkeman, *Biophys. J.*, **1983**, *44*, 315.
52. Jones, R. A. L.; Richards, R. W. *Polymers at Surfaces and interfaces*; Cambridge University Press: Cambridge, **1999**.
53. R. C. Advincula, W. J. Brittain, K. C. Caster, J. Rühle(Eds.), *Polymer Brushes*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
54. E. Stenberg, B. Persson, H. Roos, und C. Urbaniczky, *J. Colloid Interface Sci.*, **1991**, *143*, 513-526.
55. J.J. Ramsden, M. Malmsten(ed.), *Biopolymers at interfaces*, Marcel Dekker, New York, **2003**.
56. O. Hollmann, T. Gutberlet, und C. Czeslik, *Langmuir*, **2007**, *23*, 1347-1353.
57. A. Wittemann und M. Ballauff, *Anal. Chem.*, **2004**, *76*, 2813-2819.
58. A. Wittemann und M. Ballauff, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2006**, *8*, 5269-5275.
59. F.A.M. Leermakers, M. Ballauff, und O. V. Borisov, *Langmuir*, **2007**, *23*, 3937-3946.
60. P. M. Biesheuvel und A. Wittemann, *J. Phys. Chem.*, **2005**, *109*, 4209-4214.

61. P. M. Biesheuvel, F. A. M. Leermakers und M. A. Cohen Stuart, Phys. Rev., **2006**, 97, 11802.
62. <http://www.ncnr.nist.gov/>
63. C. Salamanca, M. Contreras und C. Gamboa, J. Colloid Interface Sci., **2007**, 309, 435.
64. K. Gast, D. Zirwer, M. Müller-Frohne und G. Damaschun, Protein Sci., **2004**, 7, 1998.
65. Schwinté, P.; Ball, V.; Szalontai, B.; Haikel, Y.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P. Biomacromolecules, **2002**, 3, 1135-1143.
66. Parratt, L. G. Phys. Rev., **1954**, 95, 359-369.
67. Su, T. J.; Lu, J. R.; Thomas, R. K.; Cui, Z. F.; Penfold, J. J. Phys. Chem. B **1998**, 102, 8100-8108.
68. Guo, X.; Ballauff, M. Phys. Rev. E, **2001**, 64, 051406.
69. O. Hollmann und C. Czeslik, Langmuir, **2006**, 22, 3300.
70. Wittemann, A.; Haupt, B.; Ballauff, M., Phys. Chem. Chem. Phys., **2003**, 5, 1671-1677.
71. Anikin, K.; Röcker, C.; Wittemann, A.; Wiedenmann, J.; Ballauff, M.; Nienhaus, G. U. J. Phys. Chem. B **2005**, 109, 5418-5420.
72. Czeslik, C.; Jansen, R.; Ballauff, M.; Wittemann, A.; Royer, C. A.; Gratton, E.; Hazlett, T. Phys. Rev. E **2004**, 69, 021401.
73. Smith, L. F., J. Medicine. **1966**, 40, 662-666.
74. V. Smirnovas, R. Winter, T. Funck, and W. Dzwolak., Chem. Phys. Chem. **2006**, 7, 1046-1049
75. Brange, J., L. Andersen, E. D. Laursen, G. Meyn, and E. Rasmussen. J. Pharmaceutical Sci., **1997**, 86, 517-525.
76. Whittingham, J. L., D. J. Scott, K. Chance, A. Wilson, J. Finch, J. Brange, and G. G. Dodson., J. Mol. Biol., **2002**, 318, 479-490.
77. S. Grudzielanek, V. Smirnovas, V. und R. Winter. Chem. Phys. Lipids. **2007**, 149, 28-39.



78. Jeffrey, P. D., B. K. Milthorpe, and L. W. Nichol., *Biochemistry.*, **1976**, 15, 4660-4665.
79. Pocker, Y., and S. B. Biswas., *Biochemistry*, **1981**, 20, 4354-4361.
80. D. Carrière, R. Krastev, and M. Schönhoff., *Langmuir*, **2004**, 20, 11465-11472.
81. Köhler, K., D.G. Shchukin, H. Möhwald und G. B. Sukhorukov., *J.Phys. Chem. B.*, **2005**, 109, 18250-18259.
82. Peters, T. *Adv. Protein Chem.* **1985**, 37, 161-245.
83. F.A.M. Leermakers, M. Ballauff und O.V. Borisov, *Langmuir*, **2007**, 23, 3937.
84. P.J. Kay und F. E. Treloar, *Makromol. Chem.*, **1974**, 175, 3207.
85. Jones, R.A.L.; Richards, R.W. *Polymers at Surfaces and interfaces*; Cambridge University Press: Cambridge, **1999**.
86. Roth, C. M.; Lenhoff, A.M. *Langmuir*, **1995**, 11, 3500-3509.
87. Buijs, J.; Hlady, V.J. *Colloid Interface Sci.*, **1997**, 190, 171-181.
88. Peters, T. *Adv. Protein Chem.*, **1985**, 37, 161-245.
89. Robinson, S.; Williams, P. A. *Langmuir*, **2002**, 18, 8743-8748.
90. Ladam, G.; Schaaf, P.; Decher, G.; Voegel, J.-C.; Cuisinier, F.J.G. *Biomolec. Eng.*, **2002**, 19, 273.
91. Guo, X.; Ballauf, M. *Phys. Rev. E*, **2001**, 64, 051406.
92. Wittemann, A.; Haupt, B; Ballauff, M., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2003**, 5, 1671-1677.
93. Ball, V.; Winterhalter, M.; Schwinte, P.; Lavalle, P.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 2357-2364.
94. La Rosa, C.; Milardi, D.; Fasone, S.; Grasso, D. *Thermochim. Acta* **1994**, 235, 231-237.
95. Wittemann, A.; Ballauff, M. *Macromolec. Biosci.* **2005**, 5, 13-20.
96. E. A. Permyakov, L. J. Berliner, *FEBS Letters*, **2000**, 473, 269-274.
97. O. Wintersteiner, H. A. Abramson, *J. Biol. Chem.*, **1932**, 99, 741-753.
98. O.D. Velev, E. W. Kaler, and A. M. Lenhoff, *Biophys. J.*, **1998**, 75, 2682-2697.

99. D. N. Brems, P. L. Brown, S. H. Nakagawa, H. S. Tager, J. Biol. Chem., **1991**, 266, 1611-1615.
100. O. Hollmann, C. Reichart, und C. Czeslik, Z.Phys.Chem, **2008**, 222, 205-215.
101. O. Hollmann, R. Steitz, C. Czeslik, Phys. Chem. Chem. Phys. , **2008**, 10, 1448-1456.
102. C. Jeworrek, O. Hollmann, R. Steitz, R. Winter, C. Czeslik, Biophys. J., im Druck.
103. P. Mateika, P. Hruby und K. Volka, Anal. bioanal. chem. , **2003**, 375, 1240.
104. C. R. Yonzon et. al., Anal. chem., **2004**, 76, 78.
105. G. Malicka et. al., J. Biomol. Screen, **2004**, 9, 208.
106. J. Campbell et. al., Clin. chem., **2004**, 50, 1942.
107. D. Yao et. al., Nucl. Acids Res., **2004**, 32, 177.
108. P. Englebienne et al., Spectroscopy, **2003**, 17, 255-273.
109. A.G. Frutos and R.M. Corn, Anal. Chem., **1998**, 70, 449A–455A.
110. K. Kurihara and K. Suzuki, Anal. Chem., **2002**, 74, 696–701.
111. M. Malmqvist, Real-time biospecific interaction analysis for the direct measurement of antibody-antigen interactions, in: *Immunotechnology*, J.P. Gosling and D.J. Reen, eds, Portland Press, London, **1993**, 61–75.
112. W.D. Wilson, Science, **2002**, 295, 2103–2105.
113. S. Boussaad, J. Pean and N.J. Tao, Anal. Chem., **2000**, 72, 222–226.
114. S.Wang, S. Boussaad, S.Wong and N.J. Tao, Anal. Chem., **2000**, 72, 4003–4008.
115. L.S. Jung, C.T. Campbell, T.M. Chinowsky, M.N.Mar and S.S. Yee, Langmuir, **1998**, 14, 5636–5648.
116. T. Zacher and E. Wischerhoff, Langmuir, **2002**, 18, 1748–1759.
117. X. Caide and S.F. Sui, Eur. Biophys. J., **1999**, 28, 151–157.
118. [www.biacore.com/lifesciences/technology/introduction/Flow\\_cells](http://www.biacore.com/lifesciences/technology/introduction/Flow_cells)